OMAGGIO

R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

IMPERIAL MYCOLOGIC
11 JULY 1935
INSTITUTE

107

G. LUCHETTI

IL METODO BATTERIOCHIMICO DI DETERMINAZIONE DELL' ASSIMILABILITÀ DELL' ANIDRIDE FOSFORICA NEL TERRENO

Memoria della *Reale Accademia dei Lincei*
Anno CCCXXXII, 1935 - XIII

1935 - XIII

REALE ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
(Anno CCCXXXII - 1935).
Serie VI. — Volume VI. — Fascicolo I.

IMPERIAL ... GICAL
11 JULY 1935
INSTITUTE

Il metodo batteriochimico di determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica nel terreno

MEMORIA
DI
G. LUCHETTI

ROMA
DOTT. GIOVANNI BARDI
TIPOGRAFO DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
1935-XIII

REALE ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
(Anno CCCXXXII - 1935).
Serie VI. — Volume VI. — Fascicolo I.

Il metodo batteriochimico di determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica nel terreno

MEMORIA
DI
G. LUCHETTI

ROMA
DOTT. GIOVANNI BARDI
TIPOGRAFO DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
1935-XIII

SERIE 6ª. — *Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.*
VOL. VI, fasc. 1°. — *Memoria presentata nella seduta del 6 maggio 1934.*

Proibita a norma di legge la riproduzione del testo e delle illustrazioni.

RELAZIONE

letta dal Corrisp. E. Carano, a nome anche del Socio P. R. Pirotta, nella seduta del 6 maggio 1934, sulla Memoria di G. Luchetti dal titolo: *Il metodo batteriochimico di determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica nel terreno.*

Il Luchetti, sviluppando un'idea espressa dal suo maestro R. Perotti fin dal 1909, ha elaborato nella sua Memoria un nuovo metodo per la determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica dei vari materiali fosfatici esistenti nel terreno o ad esso forniti sotto forma di concimi.

Questo metodo, a differenza di quelli ufficiali finora in uso, è di natura biochimica, in quanto si basa sull'importanza, ormai assodata, che hanno i batteri del suolo nel favorire quelle reciproche azioni fra le sostanze nutritive del terreno, che portano alla solubilizzazione e quindi all'assimilabilità dei fosfati.

Il nuovo metodo, indicato dall'autore col nome di *batteriochimico*, viene suffragato da un grande numero di esperienze durate un anno e mezzo ed eseguite con molta esattezza ed accorgimento sia nel laboratorio che nel campo.

Con le esperienze di laboratorio il Luchetti ha ricercato una soluzione nutritiva atta a permettere ai batteri del terreno in essa inoculati la maggiore attività solvente sui fosfati e di essa si è valso per procedere alle prove di assimilabilità di diversi materiali fosfatici (fosfato tricalcico puro Merk, perfosfato minerale e di ossa, scorie Thomas, fosforiti di varia provenienza). Durante il corso del lavoro il Luchetti ha fatto uso di apparecchi da lui stesso ideati ed ingegnosamente modificati a seconda delle esigenze sperimentali.

Le esperienze di controllo, compiute in pien'aria con piante di grano allevate in terreno e concimate con fosfati diversi, hanno confermato i risultati delle esperienze di laboratorio e comprovato la bontà del nuovo metodo, il quale, secondo l'Autore, potrebbe applicarsi, opportunamente modificato, alla valutazione dell'assimilabilità, oltre che dei fosfati, anche di altri sali indispensabili ad un normale sviluppo delle piante coltivate.

La Commissione ha riportato ottima impressione dalla lettura del lavoro del Luchetti, onde ha l'onore di proporne la stampa per intero nelle Memorie dell'Accademia.

P. R. Pirotta
E. Carano, *relatore*.

SERIE 6ª. — *Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.*
VOL. VI, fasc. 1°. — *Memoria presentata nella seduta del 6 maggio 1934.*

Proibita a norma di legge la riproduzione del testo e delle illustrazioni.

RELAZIONE

letta dal Corrisp. E. CARANO, a nome anche del Socio P. R. PIROTTA, nella seduta del 6 maggio 1934, sulla Memoria di G. LUCHETTI dal titolo: *Il metodo batteriochimico di determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica nel terreno.*

Il Luchetti, sviluppando un'idea espressa dal suo maestro R. Perotti fin dal 1909, ha elaborato nella sua Memoria un nuovo metodo per la determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica dei vari materiali fosfatici esistenti nel terreno o ad esso forniti sotto forma di concimi.

Questo metodo, a differenza di quelli ufficiali finora in uso, è di natura biochimica, in quanto si basa sull'importanza, ormai assodata, che hanno i batteri del suolo nel favorire quelle reciproche azioni fra le sostanze nutritive del terreno, che portano alla solubilizzazione e quindi all'assimilabilità dei fosfati.

Il nuovo metodo, indicato dall'autore col nome di *batteriochimico*, viene suffragato da un grande numero di esperienze durate un anno e mezzo ed eseguite con molta esattezza ed accorgimento sia nel laboratorio che nel campo.

Con le esperienze di laboratorio il Luchetti ha ricercato una soluzione nutritiva atta a permettere ai batteri del terreno in essa inoculati la maggiore attività solvente sui fosfati e di essa si è valso per procedere alle prove di assimilabilità di diversi materiali fosfatici (fosfato tricalcico puro Merk, perfosfato minerale e di ossa, scorie Thomas, fosforiti di varia provenienza). Durante il corso del lavoro il Luchetti ha fatto uso di apparecchi da lui stesso ideati ed ingegnosamente modificati a seconda delle esigenze sperimentali.

Le esperienze di controllo, compiute in pien'aria con piante di grano allevate in terreno e concimate con fosfati diversi, hanno confermato i risultati delle esperienze di laboratorio e comprovato la bontà del nuovo metodo, il quale, secondo l'Autore, potrebbe applicarsi, opportunamente modificato, alla valutazione dell'assimilabilità, oltre che dei fosfati, anche di altri sali indispensabili ad un normale sviluppo delle piante coltivate.

La Commissione ha riportato ottima impressione dalla lettura del lavoro del Luchetti, onde ha l'onore di proporne la stampa per intero nelle Memorie dell'Accademia.

P. R. PIROTTA
E. CARANO, *relatore*.

Il metodo batteriochimico di determinazione dell'assimilabilità dell'anidride fosforica nel terreno.

Memoria di G. LUCHETTI [1]

I metodi chimici per la determinazione della assimilabilità dell'anidride fosforica nel terreno sono puramente convenzionali: per le scorie Thomas si utilizza la solubilità in soluzioni di acido citrico al 2 %, per i perfosfati quella in citrato ammonico (metodi ufficiali). L'impiego di tali solventi è basato e giustificato dal presupposto che le secrezioni radicali delle piante (potere di digestione) abbiano un valore solvente in qualche modo paragonabile a quello del reattivo di Wagner. Presupposto, del resto, che scientificamente, allo stato attuale della scienza biologica, non ha più valore alcuno e che come teoria ha già fatto il suo tempo in quanto oggi non si può più ammettere che la solubilizzazione dell'anidride fosforica nel terreno avvenga per semplice azione delle secrezioni radicali. L'intervento della microflora del terreno nel ciclo biochimico dell'anidride fosforica non ha più bisogno di ulteriori conferme. I metodi ufficiali astraggono completamente dal lavorìo microbiochimico del terreno che invece deve avere una grandissima importanza nel fenomeno, dal momento che tutte le più recenti ricerche concordano nell'attribuire ad esso un ufficio preponderante nell'assimilabilità (dissoluzione e dializzazione) degli elementi biogeni per le piante.

Nel caso speciale dell'anidride fosforica è risultato poi da ricerche di Perotti che le azioni chimiche del terreno tendono alla trasformazione di essa in composti insolubili (retrogradazione); hanno quindi dal punto di vista che ci occupa un ruolo negativo. Le azioni microrganiche, al contrario, sono risultate dalle ricerche dello stesso Autore di un valore indubbiamente ed essenzialmente dissolutivo; per modo che queste stabiliscono con le prime un ciclo chiuso di mobilità dell'anidride fosforica nel suolo coltivabile.

Sorse pertanto al Perotti [2] per il primo (1909) l'idea di determinare l'assimilabilità dell'anidride fosforica, sia nei concimi che nel terreno, traendo profitto

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Batteriologia del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa.

(2) R. PEROTTI, *Sul ciclo biochimico dell'anidride fosforica nel terreno agrario*. G. Bertero e C. Roma, 1909.

delle attività microbiche e particolarmente batteriologiche; ed invero nel suo fondamentale lavoro: *Sul ciclo biochimico dell'anidride fosforica nel terreno agrario*, basandosi sui risultati di ben numerose esperienze venne a delineare il metodo di determinazione dell'assimilabilità dei fosfati con queste parole:

«Mediante lo studio delle leggi che regolano la soluzione batterica dell'anidride fosforica, nella seconda parte delle presente Memoria, venne posta in luce tutta l'importanza che spetta ai microrganismi nel fenomeno e, non solo quali produttori di acido ed agenti di sintesi della sostanza organica fosforata, ma anche quali fattori principali di quelle reciproche reazioni fra gli elementi nutritivi del terreno e delle concimazioni, i quali permettono l'utilizzazione dei sali fisiologicamente acidi nella dissoluzione dei fosfati.

« Di qui l'opportunità che un nuovo periodo s'instaurasse nella storia dei mezzi per determinare l'assimilabilità dei materiali fosfatici e nel quale fosse tenuto in debito conto il fattore biochimico ».

Di questo metodo egli prospettava la necessità di una conveniente elaborazione che si proponeva di fare in seguito.

Nel 1915 H. R. Christensen [1], pubblicava un lungo studio circa l'influenza delle proprietà del terreno sulla vita batterica e la trasformazione dei corpi in esso, nel quale un particolare capitolo è dedicato alla determinazione biologica del contenuto del terreno in anidride fosforica solubile. In esso è provato il comportamento di campioni di terra di fronte ad una soluzione di mannite priva di fosfati onde ottenere alcuni dati sul quantitativo di questi materiali abbastanza solubili, misurandolo indirettamente per mezzo dello sviluppo dell'*Azotobacter* e della conseguente fissazione di azoto. L'A. trovò che soltanto pochissimi terreni, in presenza della soluzione priva di fosforo, possono permettere lo sviluppo dell'*Azotobacter*: in tal caso la determinazione del bisogno in fosforo del terreno è ritenuta non probante.

Per determinare allora il valore di piccole differenze nel contenuto in anidride fosforica nei vari terreni pensò di aggiungere alla soluzione di mannite quantità diverse di $K_2 HPO_4$ (gr. 0.0005 ÷ 0.005) allo scopo di osservare in presenza di quale contenuto di esso lo sviluppo dell'*Azotobacter* avesse luogo ed in quale delle prove raggiungesse il massimo. Dalla ricerca risultò che in queste condizioni i diversi terreni per determinare un vigoroso sviluppo dell'*Azotobacter* richiedevano pesi molto differenti di anidride fosforica aggiunta. L'A. peraltro ritiene che, per diverse cause, anche questo modo di determinazione biologica dell'anidride fosforica non chiarisce sufficientemente il bisogno per essa del terreno.

I risultati del metodo ideato non presentano quindi alcun che di conclusivo; e l'A. si limita ad affermare genericamente che soltanto una vigorosa vegetazione di *Azotobacter* ottenuta con l'impiego di mannite in assenza di fosforo aggiunto può permettere di affermare che il terreno non è deficiente per questo biogeno.

(1) H. R. Christensen, *Studien über den Einfluss der Bodenbeschaffenheit auf das Bakterienleben und den Stoffumsatz im Erdboden*. «Centr. für Bakt. II Abt.», Bd. 43, 1915.

Nel 1924 Pantanelli [1] propose un altro metodo di determinazione dell'anidride fosforica assimilabile contenuta nel terreno. Tale metodo è basato sul forte potere dissolvente che presentano alcuni funghi per i fosfati insolubili ed era realizzato mediante la coltura di detti funghi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* ed altri) in scatole di Koch contenenti gr. 100 di terreno in esame addizionato di cc. 200 di soluzione di saccarosio al 10 % e solfato ammonico al 2 % e sterilizzate per tre volte in tre giorni consecutivi in autoclave a 120° C. Al settimo giorno di coltura il feltro formatosi sulla superficie del liquido si asportava e dopo calcinazione in presenza di soda se ne determinava il contenuto in anidride fosforica.

Il metodo Pantanelli presenta, a nostro modo di vedere, l'inconveniente di un imperfetto contatto tra il fungo, le sue secrezioni acide ed il terreno che in uno strato più o meno compatto si deposita al fondo del recipiente.

Nello stesso anno Lumia [2] propose un altro metodo da lui studiato ma non elaborato a fondo il quale trae profitto dall'assoluto bisogno che presenta il *Saccharomyces cerevisiae* di substrati contenenti fosforo per lo svolgimento della sua attività fermentatrice. Somministrando quindi a questo microrganismo diversi fosfati od anche diversi terreni in un substrato privo di altre sorgenti di anidride fosforica si può valutare l'assimilabilità dell'anidride fosforica in essi contenuta misurando esattamente la quantità di anidride carbonica sviluppata entro un determinato tempo.

Nel 1927 Truffaut e Bezssanoff [3] ripresero il metodo Christensen dell'*Azotobacter* sperimentandolo su *Azotobacter agile*, *Clostridium Pasteuriamum* e *Bacillus Truffauti*. Anche questi AA. però non giunsero più in là di quanto era giunto lo stesso ideatore del metodo.

Nel 1930 Niklas, Poschenrieder e Trischler [4] pubblicarono un nuovo metodo microbiologico per la determinazione del bisogno in concime del terreno, basato sulla misura dello sviluppo dell'*Aspergillus niger* (metodo dell'Aspergillo) ritenendo che esso risultasse preferibile ai metodi di Mitscherlich e di Neubauer (metodo della germinazione), quanto meno per semplicità e rapidità.

Il metodo corrisponde in sostanza, anzi coincide perfettamente con quello proposto già sei anni prima da Pantanelli al quale deve essere fatta giustizia della priorità.

(1) E. PANTANELLI, *Determinazione biochimica del fosfato assimilabile del terreno*. Act. IV. Conf. Int. de Pédologie, vol. III, Roma, 1924.

(2) C. LUMIA, *Nuovo metodo di valutazione della assimilabilità di materiali diversi concimanti*. Ivi.

(3) TRUFFAUT G. et BEZSSANOFF N., *Mesure de l'assimilabilité de divers phosphates sur la fixation bactérienne de l'azote*. «Comp. Rend. Acad. Sc.», Paris, 1927.

(4) H. NIKLAS, H. POSCHENRIEDER und I. TRISCHLER, *Eine neue mikrobiologische Methode zur Feststellung der Düngebedürftigkeit des Bodens* «Die Ernährung der Pflanze», XVIII, 1930. – *Die Kultur des Schimmelpilzes Aspergillus niger zur biochemischen Bestimmung der Kali– und Phosphorsäuredüngebedürftigkeit des Bodens*. Ivi.

Esso riguarda particolarmente la determinazione della deficienza del terreno in potassa [1] e ha permesso di concludere come il procedimento con l'Aspergillo offre risultati apprezzabilmente concordanti con quello della germinazione di Neubauer. È stata anzi riscontrata una relazione matematica tra i due metodi la quale permette la sostituzione di quello più agevole dell'Aspergillo all'altro.

Da questa breve rassegna bibliografica risulta adunque che i metodi biochimici proposti per la determinazione del quantitativo e del valore dell' assimilabilità degli elementi nutritivi del terreno per le piante sono due: l'uno batteriologico (Perotti e Christensen), l'altro micologico (Pantanelli–Lumia).

A prescindere da ogni altra considerazione riguardante in se stesse le modalità del metodo è da ritenere che *il metodo batteriologico deve presentare un valore superiore a quello micologico in quanto che esso tende all'impiego di attività le quali sono realmente quelle efficienti nelle condizioni naturali del suolo.*

Circa il metodo batteriologico è poi da rilevare che quello dell'*Azotobacter*, che fa capo a Christensen, anche se poi copiato da altri e passato per nuovo, prenderebbe a base della indagine una sola forma, dato e non concesso che tale. microrganismo sia realmente da annoverare tra i batteri. Il metodo Perotti – cui spetta indiscutibilmente la priorità dell'idea – al contrario prende in considerazione l'attività *complessiva* di tutte le forme che sono nel suolo e non si preoccupa di cimentarne una o poche soltanto, anche per il fatto che agenti strettamente specifici della solubilizzazione del fosforo nel suolo non sono risultati dalle sue numerose ricerche.

Per questo motivo, dando la preferenza al metodo, che si può ben qualificare *batteriochimico*, di Perotti, ci si è proposti di svilupparlo, di fissarne le modalità e di darne una prima conferma nei risultati delle prove di vegetazione eseguite.

Non deve meravigliare il termine di « batteriochimico » con cui si è designato il metodo ove si pensi che, come meglio si vedrà dal completo svolgimento del lavoro, nelle condizioni in cui sono poste le colture, anche trattandosi di colture brute, è da escludere uno sviluppo di funghi a micelio; e se pure ha luogo un leggero sviluppo di *Saccharomycetaceae* esso deve essere di un valore ridottissimo in quanto viene a trovarsi in concorrenza con quello degli schizomiceti. L'azione di questi è quindi di gran lunga più marcata, se pure non esclusiva, rispetto a quella micologica. Ond'è che per le basi su cui è fondato ed in relazione al termine più lato di « microbiochimico » si è dato al metodo il nome di « batteriochimico ».

Riassumendo quindi, quanto si è esposto circa i vari metodi di determinazione dell'assimilabilità dei fosfati, sia nelle sostanze concimanti che nel terreno, si può affermare che il metodo batteriochimico ha sugli altri i seguenti vantaggi:

(1) H. Niklas und M. Miller, *Grundlegend Untersuchungen über den Zusammenhang der Ergebniffe der Keimpflanzen und der Aspergillus Methode.* Ivi, XXVIII, 1932.

I. – *Sul metodo chimico ufficiale* quello di avvicinarsi di più a quelle che sono le condizioni del terreno circa il giuoco dei fattori di solubilizzazione dei fosfati insolubili, in quanto non è affatto provato che i vari reattivi corrispondano realmente al valore delle secrezioni radicali o dell'acidificazione dell'umo e non si tien conto altro che di una parte di tali fattori che non è detto sia la preponderante come intensità e non lo è certo come sfera di azione in quanto dette secrezioni agiscono solo su un limitato volume del terreno arabile mentre le azioni microbiche si svolgono in tutto lo spessore dello strato sia pur non uniformemente per effetto o della distribuzione dei batteri, decrescente dall'alto in basso, o della loro attività maggiore o minore in vicinanza delle radici.

II. – *Sul metodo micologico Pantanelli* quello di permettere un attacco più diretto e più uniforme sul materiale in esame evitando depositi più o meno compatti e più o meno facilmente penetrabili dai fattori dissolutivi; inoltre quello di agire con le forme microbiche che realmente hanno un forte sviluppo nel terreno invece che con qualche forma che nel terreno non acido, cioè, normale si trovano spesso allo stato di vita ridotta o latente (spore). Tutto questo poi a prescindere dalla semplicità del metodo batteriochimico rispetto a quello micochimico per il fatto che nel primo non occorrono tutte le precauzioni, spesso infruttuose, cui si deve ricorrere per ottenere colture rigorosamente scevre di ogni e qualsiasi inquinamento.

III. – *Sul metodo blastomicetico Lumia* gli stessi vantaggi che su quello Pantanelli, ove si eccettui la minore manualità richiesta dalla lettura di un volume di gas in luogo delle lunghe e minuziose analisi per la ricerca quantitativa della P_2O_5.

IV. – *Su tutti i metodi* poi quello di poter valutare l'assimilabilità di un fosfato non con cifre più o meno astratte che non rendono esattamente i valori cercati, ma con cifre della massima esattezza perchè quello che si verifica *in vitro* si verificherà se pur in tempo più o meno lungo anche nelle condizioni naturali del suolo poichè tale assimilabilità non è valutata a mezzo di fattori più o meno estranei al terreno, ma insiti in esso.

Infine, il metodo batteriochimico permette di determinare l'assimilabilità dei concimi fosfatici insolubili non genericamente ma per ciascun terreno cui essi sono destinati e, si può dire per ciascuna coltura e su ciascun suolo in quanto è noto [1] che la « edafosfera » delle diverse specie di colture ha varia attività sulla solubilizzazione dei fosfati forse in relazione alle diverse specie batteriche selezionate dall'attività della pianta stessa. Tale attività fa risentire i suoi effetti

(1) O. Verona e G. Luchetti, *La dissoluzione del fosforo per attività dei microbi della rizosfera.* « Boll. R. Istituto Sup. Agrario di Pisa », vol. VII, 1931; R. Perotti, *Lezioni di Patologia vegetale e Batteriologia agraria.* Vol. IV, parte I: *Batteriologia del terreno,* Pisa, 1934.

su tutte le funzioni microbiche del suolo ed in conseguenza anche su quella di dissoluzione del fosforo in quanto ad esempio l'esaltazione del potere nitrificante del terreno non può a meno di risolversi in una esaltazione del potere dissolutivo.

La parte sperimentale del presente studio si distingue come segue:

Parte I – *Esperimenti di Laboratorio* (metodo indiretto):
- 1° descrizione dell'apparecchio;
- 2° descrizione dei recipienti;
- 3° condizioni generali di esperienza;
- 4° probabili cause di errore;
- 5° descrizione delle esperienze;
- 6° modificazione all'apparecchio ed altre esperienze;
- 7° osservazioni e fissazione del metodo;
- 8° determinazione, con il metodo fissato, dell'assimilabilità di diversi fosfati;
- 9° altre applicazioni del metodo proposto.

Parte II – *Esperimenti su coltivazioni* (metodo diretto).

PARTE SPERIMENTALE

Parte I. – Esperimenti di laboratorio – Metodo indiretto.

1. – *Descrizione dell'apparecchio.*

Per le esperienze venne usato un apparecchio appositamente costruito. Lo schema dell'apparecchio, una descrizione dettagliata del quale è necessario premettere, fu dedotto dallo studio di Perotti *Sul ciclo biochimico dell'anidride fosforica*, a p. 202, fig. 16. Esso risulta costituito dalle seguenti parti:

a) una base di legno, rettangolare, che sorregge e lega tutti gli organi;

b) un motorino elettrico per corrente trifase (industriale) della potenza di 0,3 HP, ruotante alla velocità di 1475 giri al minuto primo;

c) un dispositivo agitatore, ruotante.

L'agitatore consta, a sua volta, di un organo di sostegno costituito da due bracci inclinati sulla verticale e riuniti agli estremi superiori a Λ e solidamente fissati con viti alla base di legno; su ciascun braccio porta una coppia di pulegge concentriche e solidali ed al vertice un foro attraversato da un perno al quale son fissate rigidamente una puleggia ad un estremo, ed un porta–palloncini all'altro.

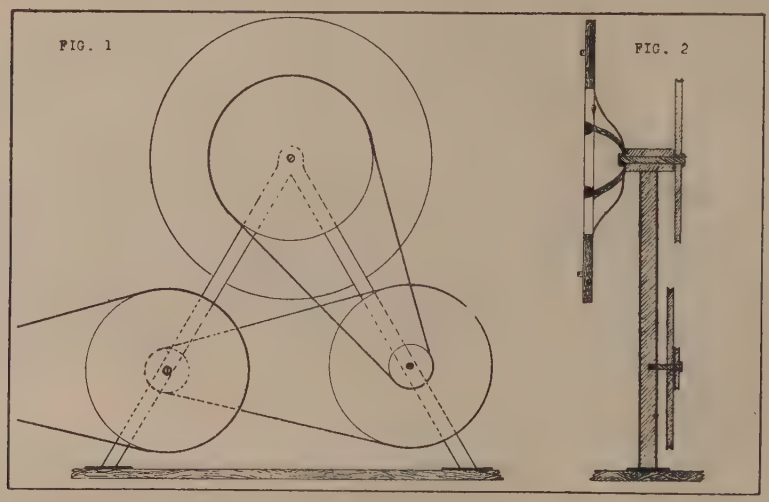
Il porta–palloncini non è altro chè un piatto circolare in lamiera d'ottone solcato da sei scanalature semicilindriche radiali, rivestite di gomma, in ciascuna delle quali si adagia perfettamente il collo di un palloncino sferico che descriveremo più sotto: il collo del palloncino è poi stretto, al di sopra, da una sbarretta incurvata serrata da due viti alle estremità. Perchè meglio si possa comprendere il montaggio dell'apparecchio riportiamo nelle figure seguenti alcuni disegni schematici dell'agitatore e di qualche particolare ed alcune fotografie dell'apparecchio completo. Più precisamente la fig. 1 rappresenta schematicamente il prospetto della parte posteriore dell'apparecchio agitatore; la fig. 2 la sezione dello stesso lungo uno dei bracci di sostegno; la fig. 3 mostra il porta–palloncini di prospetto e la fig. 4 lo stesso in sezione. Le fig. 5 e 6 sono fotografie dell'apparecchio completamente montato.

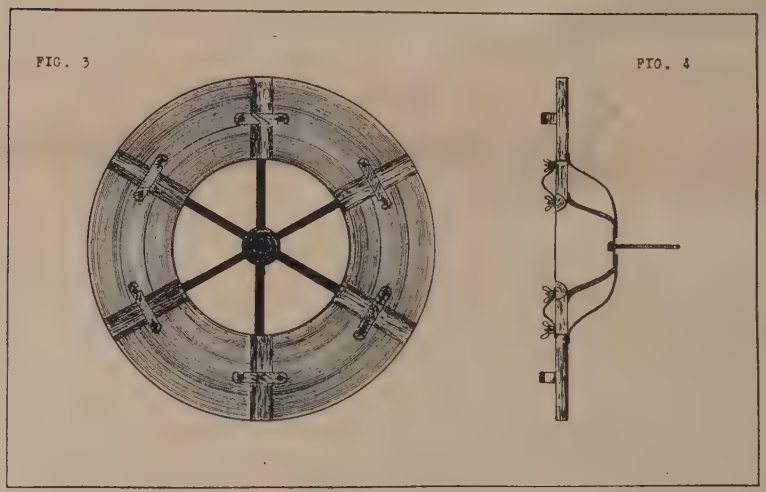
Nelle fotografie è visibile il motorino elettrico il cui asse porta una puleggia multipla onde poter variare, entro certi limiti, la velocità di rotazione dell'apparecchio agitatore cioè da 8 a 24 giri al minuto primo.

I rapporti di trasmissione delle pulegge dell'apparecchio sono di circa 1 : 10; il rapporto finale di trasmissione varia invece a seconda della puleggia in presa sull'albero motore, da 1 : 61,4 a 1 : 184; gli intermedi sono di 1 : 92 e di 1 : 123.

Per poter usare dei diversi rapporti era naturalmente necessario che i due organi principali (motore ed agitatore) potessero variare la loro posizione reci-

proca ciò che fu ottenuto tenendo fisso l'agitatore e montando il motore su di un piccolo basamento spostabile in due sensi normali tra loro. Tale basamento è costituito da un regolo di legno a sezione trapezia, fissato alla base dell'appa-





recchio con due viti a dado capaci di scorrere entro due feritoie, parallele, della base stessa in modo da potersi spostare in senso antero–posteriore; da due regoli pure trapezi, in legno fissi sui piedi di base del motore, scorrenti ai lati del primo regolo in modo da formare una coda di rondine e tali da permettere lo spostamento laterale. Lo schema di tale dispositivo è rappresentato dalla fig. 7 in cui AA è la feritoia della base; BB il primo regolo; CC gli altri due, fissi al motore con le

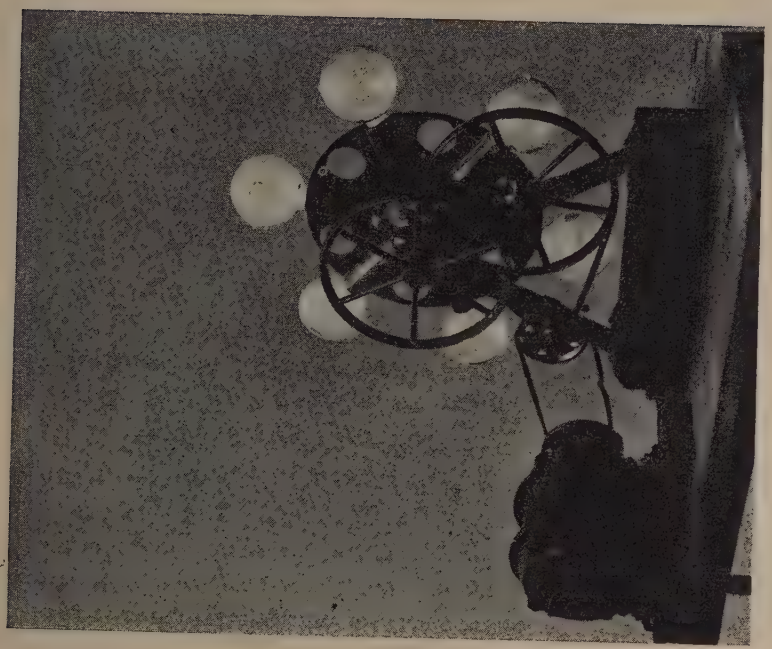


Fig. 6.

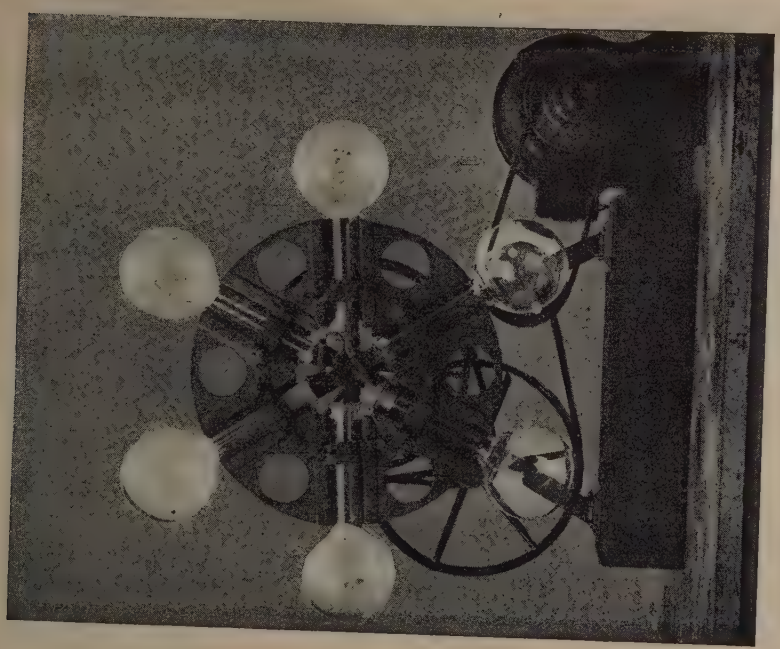


Fig. 5.

viti V''; DD i piedi di base del motore; E il corpo dell'involucro in ghisa del motore, sezionato lungo l'asse del motore; V' la vite d'arresto dei movimenti di avanzamento del dispositivo.

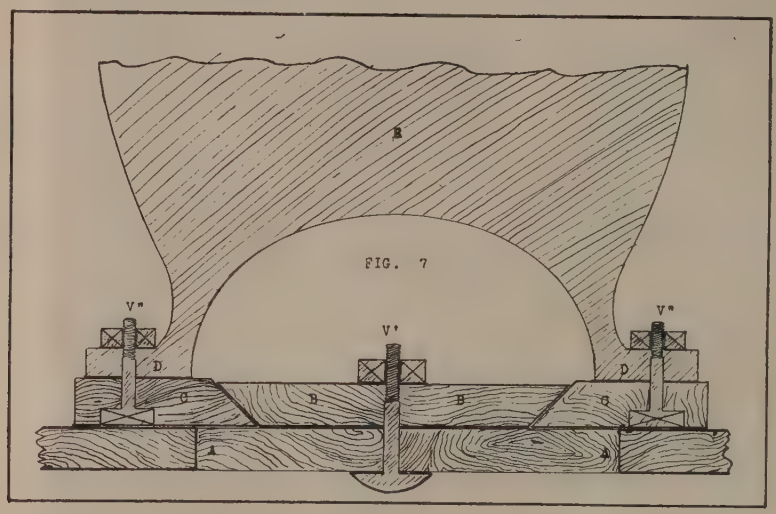


FIG. 7

2. – *Descrizione dei recipienti.*

I recipienti prescelti per le esperienze furono, in un primo tempo, palloncini sferici da 250 cc., a collo lungo, di diametro massimo mm. 75, di lunghezza del collo mm. 105. In seguito fu cambiato il tipo di palloncino per ragioni che vedremo nel corso delle esperienze. I palloncini usati sul principio erano di vetro sottile (spessore normale delle vetrerie resistenti al fuoco come beute ecc.) in modo da presentare il vantaggio del minimo peso morto da mettere in rotazione con il motorino; ciò soprattutto perchè dovendo l'apparecchio lavorare in termostato, era assolutamente da evitare il surriscaldamento del motore stesso per sforzo eccessivo.

La capacità dei palloncini (250 cc.) era la minima necessaria alle esigenze di esperienza, ciò che d'altronde si rese vantaggioso, date le esigue dimensioni del termostato usato nelle prime esperienze. In seguito potendo disporre di un termostato più ampio, si poterono usare palloncini di maggiore dimensioni.

3. – *Condizioni generali di esperienza.*

Sono anzitutto da fissare le condizioni generali di esperimento per non ripeterle ogni qual volta verranno descritte le esperienze.

a) *Velocità di rotazione.* — Fu adottata come velocità–base quella di 16 giri al minuto primo. Le eventuali variazioni saranno indicate nelle singole esperienze.

b) *Durata dell'agitazione.* — Non potendosi, per ragioni di sorveglianza, mantenere costantemente in moto l'apparecchio si stabilì di limitare l'agitazione a 10 ore al giorno, cioè dalle ore 9 alle 19.

c) *Temperatura.* — Non fu possibile ottenere durante il lavoro una temperatura costante, avendosi lente variazioni di essa per effetto di un leggero riscaldamento del motore; durante il giorno quindi la temperatura del termostato segnava un minimo di 24°C. ed un massimo di 29° per ridiscendere durante la notte; la temperatura media ad ogni modo può ritenersi di 26°–27° C.

d) *Materiale di inoculazione.* — Le inoculazioni furono sempre eseguite con stemperamento acquoso 1/1 di terreno prelevato volta per volta da una parcella dell'Orto sperimentale annesso ai laboratori di Batteriologia e Patologia. Detta parcella fu appositamente riservata al lavoro in corso nè fu mai, per diciotto mesi consecutivi (tempo che è durato il presente lavoro), concimata e coltivata; inoltre fu tenuta anche libera dalla vegetazione spontanea.

Tutto ciò perchè non si verificassero, o per lo meno lo fossero nella misura minima possibile, variazioni all'infuori di quelle stagionali, del contenuto quantitativo e qualitativo dei germi presenti all'inizio delle esperienze.

e) *Chiusura dei palloncini.* — Dovendo i recipienti di coltura ruotare in un piano verticale, occorreva naturalmente chiuderli onde evitare perdite di liquido. D'altra parte, essendovi, in conseguenza dell'attacco della sorgente carboidrata, forte sviluppo di gas da parte delle colture, si rendeva necessaria l'eliminazione periodica del gas stesso onde evitare pressioni troppo forti. A ciò provvedemmo, nelle prime esperienze, chiudendo i palloncini con un tappo di gomma, forato, ben legato ed assicurato al collo del recipiente con una sottile funicella per evitare che si aprisse. Il foro del tappo si fece attraversare da una corta canna di vetro raccordata all'esterno con un tubo di gomma chiuso alla estremità libera da una pinzetta di Mohr. Periodicamente si apriva la pinzetta, dopo aver portato il palloncino in posizione verticale per dare sfogo al gas prodottosi. Essendosi però con tale sistema constatata una leggera perdita di liquido dovuta alla parte che si immagazzinava nel tubo di gomma e nella canna di vetro, si pensò in seguito di applicare al tubo di gomma, prima dell'apertura della pinza, una pipetta munita di bolla, perchè servisse da tubo di sicurezza.

Il liquido che si raccoglieva nella bolla si ricacciava poi nel palloncino soffiandovi dentro. L'apertura dei recipienti, con questo sistema, si fece di solito ogni 2–3 ore, durante il giorno.

f) *Volume di liquido.* — Il volume di liquido colturale immesso nei palloncini ad ogni esperienza fu di cc. 170; ciò che permise di operare tre successivi prelevamenti di cc. 50 di liquido da analizzare, dallo stesso palloncino e per ciascuna esperienza. Gli 80 cc., residui della capacità del recipiente, erano necessari sia all'agitazione del liquido, sia all'immagazzinamento di gas durante la notte, quando non era possibile eliminarlo.

g) *Composizione del liquido colturale.* — La composizione del liquido

colturale variò da esperienza ad esperienza specie per quel che riguarda la sorgente carboidrata e quella azotata, sia per la qualità che per la quantità.

La composizione fondamentale del liquido però fu sempre la seguente:

A	solfato di magnesio	0,1	costante
	» di manganese	0,1	
	cloruro ferrico.	0,1	
	» sodico	tr.	
	solfato potassico	tr.	
	acqua distillata su vetro [1]. . .	1000	
B	sorgente alim. carboidrata		variabile
	» » azotata		
	» » fosforata		

una, *A*, costante, l'altra, *B*, variabile. Perciò in ciascuna delle esperienze che seguono riporteremo sola la natura e la quantità della parte *B*, restando presupposta la presenza costante dell'altra nella composizione indicata.

h) *Materiale fosfatico impiegato.* — Nelle prime esperienze l'unica sorgente fosforata impiegata, fu il fosfato tricalcico purissimo «Merk» che all'analisi chimica più volte ripetuta risultò così composto:

P_2O_5	=	45,74 %
CaO	=	54,16 »
H_2O	=	0,10 »
		100,00 %

cioè di una purezza assoluta se si prescinde all'1 ‰ di acqua igroscopica contenuta nel materiale in esame. Tale fosfato servì per tutte le esperienze.

i) *Procedimento analitico.* — Per determinare la quantità di P_2O_5 disciolta nel corso delle esperienze, nei recipienti di coltura, si operò come segue: si prelevava dal palloncino con una pipetta tarata, previa agitazione, una certa quantità di liquido prestabilita (50 cc. o 100 cc.), e si filtrava con aspirazione attraverso carta da filtro cilindrata a filtrazione lenta, asciutta, su un imbuto di porcellana a fondo piatto, bucherellato, innestato su una beuta di vetro spesso nella quale attraverso una tubulatura laterale si creava depressione barometrica mediante

(1) Per ottenere acqua assolutamente pura si ricorse alla bidistillazione dell'acqua distillata di laboratorio ed alla sua aereazione con gorgogliamento di aria lavata attraverso calce sodata idrato di sodio ed idrato di bario.

pompa aspirante. Al liquido prelevato se ne aggiungevano ancora, sul filtro 4–5 cc., onde supplire alle perdite per imbibizione del filtro.

Il filtrato si prelevava ancora con altra pipetta tarata, nella misura stabilita e si portava sul bagnomaria svaporandolo e riprendendo varie volte con HNO_3 conc. fino a che si notava sviluppo di vapori bruni; si portava quindi quasi a secco e si eseguiva la determinazione della P_2O_5 col metodo Woy con molibdato ammonico in soluzione nitrica.

Le analisi furono fatte dopo un numero di giorni–coltura prestabilito e riportato per ciascuna esperienza.

Per la determinazione della solubilizzazione iniziale, cioè senza intervento batterico, si operava come segue: a cc. 170 di liquido colturale si aggiungeva la quantità prestabilita di materiale fosfatico, si poneva in termostato per 6 ore (minimo) alla temperatura d'esperienza, dopo di che si filtrava, si prelevavano 100 cc. di filtrato e si trattavano come si è detto precedentemente.

* * *

Premesso questo passiamo alla descrizione delle singole esperienze ed alla discussione dei risultati i quali sono riportati per ogni esperienza con una tabella ed un grafico; inoltre è riportata la « solubilizzazione media », cioè un unico numero risultante dal complesso delle analisi. Per esprimere ciò in forma analitica chiamiamo con:

Si la solubilizzazione iniziale;

Sm la solubilizzazione media;

$S = S_1 , S_2 , S_3 , \cdots S_n$ le solubilizzazioni riscontrate nelle diverse analisi.

La solubilizzazione media nella durata dell'esperienza sarà allora:

$$Sm = \frac{\sum_1^n S}{n} - Si .$$

Il valore di Sm è riportato anche nei grafici con una linea orizzontale a tratto e punto.

4. – *Probabili cause d'errore.*

A parte gli errori analitici in cui si può incorrere anche all'infuori della perizia e della scrupolosità dell'analista, specie quando si ha a che fare con quantità minime di sostanza e con procedimenti lunghi e complicati come il metodo Woy per la determinazione ponderale del fosforo, altri errori, inevitabili, si commettono col metodo da noi seguìto.

Le principali cause che possono indurre in errore nel determinare la solubilizzazione del fosfato tricalcico nelle colture batteriche sono le seguenti:

a) Una prima è data dai prelevamenti successivi di liquido dallo stesso recipiente. Non è infatti possibile (e ciò si potrebbe anche provare sperimentalmente) prelevare da un miscuglio di liquidi e solidi una parte aliquota la quale contenga liquidi e solidi nelle stesse proporzioni della parte rimanente, anche dopo aver lungamente agitato.

Ne conseguiva quindi, nel nostro caso, un arricchimento o impoverimento del liquido che rimaneva per le determinazioni successive, rispetto al titolo prefissato in P_2O_5, per raggiungere il quale si era scrupolosamente pesata una determinata quantità di materiale fosfatico da addizionare ad un non meno esatto volume di liquido.

Di ciò può far fede, per citare un esempio ben controllabile, la ricerca n. 199 in cui si è trovata una quantità di P_2O_5 disciolta del 101,6 %. Senza contare che, forse, un'altra parte era rimasta indisciolta ed un'altra ancora non è stata determinata per ragioni che esponiamo appresso.

b) Perdite di sostanza di entità difficilmente valutabili per effetto della filtrazione la quale se lascia passare molti degli elementi figurati costituenti la sostanza organica contenuta nei liquidi culturali, molti tuttavia ne trattiene specie se riuniti in fiocchi, grumi, membrane ecc.

Talvolta si è verificato di veder rimanere sul filtro, specie dopo le filtrazioni dei liquidi colturali degli ultimi prelevamenti (12°–15° giorno), quantità notevolissime di sostanza organica contenenti necessariamente fosforo organico.

D'altra parte non è a credersi sia possibile scindere e valutare partitamente quanto del fosforo rimasto sul filtro spetti alla sostanza fosforata di origine minerale e a quella di origine organica.

c) Altra causa di errore per quel che riguarda il massimo di solubilizzazione dei fosfati insolubili è, naturalmente, la distanza intercorrente fra determinazione e determinazione.

È ormai noto ed accettato, e ne abbiamo avute numerose conferme sperimentali, che il fenomeno in parola nei liquidi colturali contenenti microrganismi, si svolge secondo una curva la quale, partendo da un minimo dato dal grado di solubilità della sostanza in esame nel liquido di coltura, alla temperatura di esperienza, si porta per gradi fino ad un massimo variabile con le innumerevoli condizioni dell'esperienza stessa, per ritornare poi ad un limite più basso che può essere costituito dal punto di partenza o da un punto intermedio tra questo ed il massimo.

Ma quando si avrà il *maximum* di solubilizzazione ? È questo che è impossibile di stabilire *a priori* ed è molto difficile anche di trovare sperimentalmente in quanto occorrerebbe eseguire numerosissime ricerche per ciascuna esperienza; ricerche che richiederebbero notevole volume di liquido colturale, del quale, nel caso particolare, non si poteva assolutamente disporre.

Anche ammettendo di compiere due determinazioni nelle 24 ore, per 15 giorni consecutivi, su cc. 50 di liquido eseguite su un unico campione, sarebbe occorso un volume di cc. 1500, esclusa ogni perdita (circa cc. 200 di perdite complessivamente). Tutto questo, a prescindere dalle altre due cause di errore surricordate, la prima delle quali avrebbe particolarmente fatto risentire il suo peso per una ricerca analitica di questo genere.

5. – *Descrizione delle esperienze.*

Esperienza I. — La presente prima esperienza ha carattere prevalentemente orientativo dovendo servire a stabilire quale avrebbe dovuto essere in via assolutamente approssimata la composizione del liquido colturale.

Il substrato impiegato comprende (nella parte *B* della soluzione nutritiva a cui naturalmente va aggiunta la parte costante *A*):

saccarosio . . . 15 %
solfato ammonico 1 »
P_2O_5 . . . . . 1 » = 2,1863 ‰ di $Ca_3 (PO_4)_2$

Le determinazioni (in doppio) furono eseguite ogni due giorni e mezzo per 15 giorni consecutivi.

I palloncini furono contraddistinti con numeri progressivi da 1 a 6 e divisi in tre coppie: ogni due giorni e mezzo si fecero i prelevamenti e le analisi del liquido di due palloncini. Una coppia di palloncini fu mantenuta sterile per aggiunta di alcune goccie di cloroformio; le altre due furono inoculate con $^1/_{10}$ di cc. di stemperamento acquoso di terreno. Dalla coppia di palloncini sterili si operò il prelevamento solo al 15° giorno di esperienza; lo scopo per cui fu lasciata la coppia sterile fu di valutare quale parte avesse la sola agitazione sulla solubilizzazione del fosfato tricalcico.

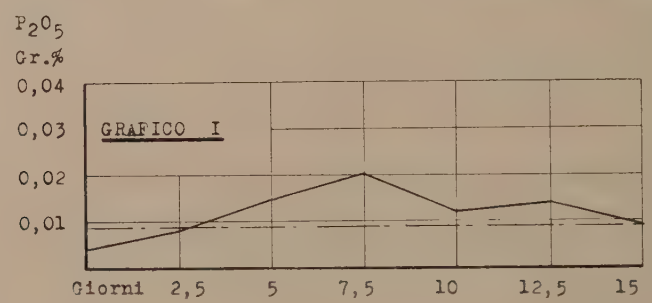
I risultati delle analisi son riportati nella tabella I e nel grafico I. La solubilizzazione massima si ebbe dopo sette giorni e mezzo con il 20,4 % (ricerca n. 8) cioè appena $^1/_5$ della totale, quindi bassissima.

La solubilizzazione media è di 0,0087, cioè dell'8,7 % di P_2O_5 introdotta nei palloncini.

La solubilizzazione dovuta al solo liquido colturale ed alla temperatura d'esperienza è del 4,2 %, mentre quella dovuta all'azione concomitante di questi due fattori e della agitazione è del 5,6 %. Ciò significa che la sola agitazione concorre alla solubilizzazione solamente con l'1,4 %, ciò che si può anche trascurare.

TABELLA I.

Ricerca N°	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta		% P_2O_5
		Singole determinazioni Grammi	Media Grammi	
1	Iniziale	0.0042	0.0042	4.2
2		0.0042		
3	2.5	0.0082	0.0080	8 –
4		0.0078		
5	5 –	0.0142	0.0147	14.7
6		0.0153		
7	7.5	0.0202	**0.0203**	**20.3**
8		**0.0204**		
9	10 –	0.0100	0.0119	11.9
10		0.0138		
11	12.5	0.0126	0.0140	14 –
12		0.0154		
13	15 –	0.0092	0.0087	8.7
14		0.0082		
15	15 –	0.0058	0.0056	5.6 Coppia sterile
16		0.0054		
		Solubilizzazione media	**0.0087**	**8.7**



Esperienza II. — I risultati della I esperienza ci suggerirono di ricercare le cause della limitata solubilizzazione ottenuta. Si pensò che fattore limi-

tante del fenomeno potesse essere la bassa concentrazione di azoto nel liquido colturale che modificammo come segue:

saccarosio . . . . . 15 ‰
solfato ammonico . . . . . 2 »
P_2O_5 . . . . . 1 »

Null'altro fu cambiato dalla I esperienza: anche in questa, come nell'altra, fu lasciata una coppia di palloncini sterili.

I risultati conseguiti sono esposti nella tabella II e nel grafico II.

La solubilizzazione media di questa esperienza sale a 0,0348, cioè esattamente quadrupla di quella dell'esperienza precedente; la massima è di 61,3 (ricerca n. 23) pure dopo sette giorni e mezzo di coltura.

In questa esperienza si ebbe, al 3° giorno, l'apertura di un palloncino per la notevole pressione verificatasi in tutti i recipienti dal principio del 3° alla fine del 6° giorno; ragioni per cui le ricerche nn. 22–26–30 non si poterono compiere, rispettivamente al 5°, 10°, 15° giorno (ricerche nn. 22–26–30), che in una unica prova mentre tutte le altre furono eseguite in doppio.

I risultati ottenuti in questa prova furono notevolmente migliori tanto da consigliare di tentare ulteriori modificazioni del liquido colturale onde ottenere, se possibile, una solubilizzazione pari al 100 %.

La solubilizzazione per opera meccanica (agitazione) determinata come precedentemente, si trovò essere uguale all'1,5 % (ricerche n. 31 e 32).

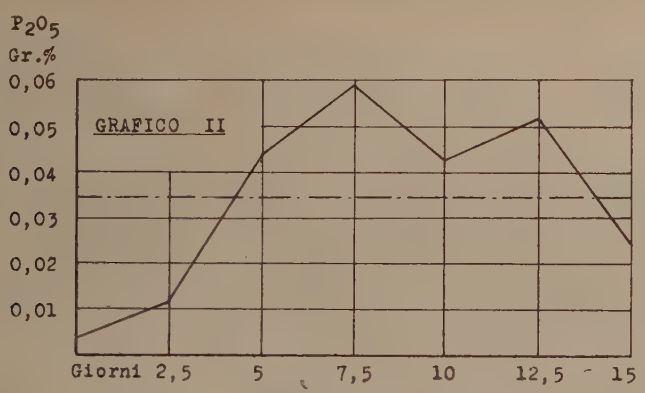


TABELLA II.

Ricerca N°	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta		% P_2O_5
		Singole determinazioni Grammi	Media Grammi	
17	Iniziale	0.0044	0.0043	4.5
18		0.0041		
19	2.5	0.0118	0.0118	11.8
20		0.0119		
21	5 —	0.0437	0.0437	43.7
22 (1)		—		
23	7.5	**0.0613**	**0.0592**	**59.2**
24		0.0572		
25	10 —	0.0429	0.0429	42.9
26 (1)		—		
27	12.5	0.0492	0.0519	51.9
28		0.0546		
29	15 —	0.0249	0.0249	24.9
30 (1)		—		
31	15 —	0.0059	0.0060	6 Coppia sterile
32		0.0062		
	Solubilizzazione media		**0.0348**	**34.8**

(1) L'apertura di un palloncino dopo i tre giorni di coltura non permise di compiere le analisi 22, 26 e 30.

Esperienza III. — Mentre le precedenti esperienze riguardavano sopratutto l'influenza esercitata dalla sorgente azotata, in questa (come in altre) si ricercò l'influenza esplicata sulla solubilizzazione del fosfato tricalcico dalla natura della sorgente carboidrata. Per il che si sostituì il glucosio al saccarosio preparando un liquido colturale di questo tipo:

glucosio . . . . . 30 ‰
solfato ammonico . . . . . 2 »
P_2O_5 . . . . . 1 »

La sostituzione del glucosio, in questa quantità, al saccarosio, faceva, *a priori*, prevedere una maggiore intensità iniziale del fenomeno.

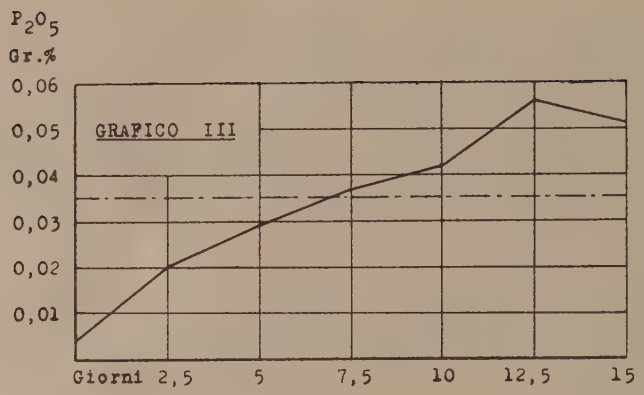
Contrariamente alle previsioni, invece, la curva del grafico III, in cui è riportato l'andamento della presente esperienza, andamento dedotto dalla tabella III che dà le cifre relative alle ricerche 33–48 di cui in questa esperienza stessa si riferisce, mostra che la solubilizzazione massima è scesa da 61,3 (ricerca n. 23) a 56,5 % (ricerca n. 43) mentre la solubilizzazione media è salita leggermente (da 34,8 a 35,2).

Ciò dimostra che il fenomeno è stato più continuo che nella esperienza precedente.

La solubilizzazione meccanica in questa terza prova è scesa all'1,2 % (ricerche nn. 47–48).

TABELLA III.

Ricerca N°	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta		% P_2O_5
		Singole determinazioni Grammi	Media Grammi	
33	Singole	0.0041	0.0041	4.1
34		0.0042		
35	2.5	0.0199	0.0202	20.2
36		0.0204		
37	5 –	0.0292	0.0290	29 –
38		0.0288		
39	7.5	0.0365	0.0367	36.7
40		0.0369		
41	10 –	0.0424	0.0419	41.9
42		0.0414		
43	12.5	**0.0565**	**0.0563**	**56.3**
44		0.0561		
45	15 –	0.0519	0.0515	51.5
46		0.0510		
47	15 –	0.0051	0.0053	5.3
48		0.0055		
	Solubilizzazione media		**0.0352**	**35.2**



Esperienza IV*a*. — Tenendo sempre presente lo scopo di queste prime ricerche che è quello di trovare il liquido colturale capace di far raggiungere la solubilizzazione massima e le altre condizioni favorevoli al fenomeno, si volle in questa esperienza indagare quale fosse l'influenza della quantità del materiale di inoculazione sulla dissoluzione del fosfato tricalcico.

Ferme rimanendo le condizioni dell'esperienza precedente fu variata la quantità di materiale d'inoculazione e invece di $^1/_{10}$ di cc., dello stemperamento acquoso fu aggiunto, nei liquidi di coltura, cc. 1.

I risultati (tabella IV – grafico IV) furono i seguenti: la solubilizzazione massima raggiunse l'88,9 % (ricerca n. 54) cifra non ancora raggiunta, al decimo giorno di coltura, con un aumento rispetto alla esperienza precedente del 32,4 %

La solubilizzazione media ebbe anch'essa un notevole aumento portandosi al 50 % (aumento del 14,8 %).

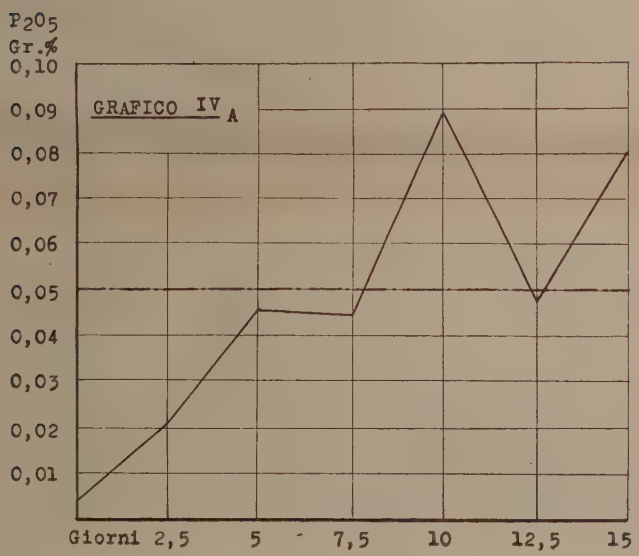
Fino ad ora, insomma, tutte le variazioni apportate alle condizioni di esperienza condussero a miglioramenti dei risultati.

A partire da questa esperienza si abbandonò la coppia dei palloncini sterili che la solubilizzazione meccanica era ormai accertato contenersi sempre in limiti molto ristretti, con una solubilizzazione media dell'1,43 %.

Anche le determinazioni in doppio furono abbandonate perchè gli scarti verificatisi tra le due determinazioni nelle prime tre esperienze non furono mai fortissimi. D'altra parte, verificandosi con una certa frequenza lo scoppio o l'apertura dei palloncini per effetto della pressione interna, si preferì lasciare alcuni recipienti di scorta per eventuali perdite di liquido.

TABELLA IV *a*.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
49	Iniziale	0.0045	4.6
50	»	0.0047	
51	2.5	0.0209	20.9
52	5 –	0.0453	45.3
53	7.5	0.0443	44.3
54	10 –	0.0889	88.9
55	12.5	0.0476	47.6
56	15 –	0.0804	80.4
Solubilizzazione media . . .		0.0500	50 –



Esperienza IV *b*. — Contemporaneamente alla precedente esperienza (IV *a*) fu eseguita un'altra esperienza parallela (IV *b*) allo scopo di accertarsi della influenza della mancata agitazione sulla solubilizzazione del fosfato tricalcico.

Per questa esperienza seguimmo le modalità di cui alla precedente con la sola differenza che invece di palloncini furono usate Erlenmeyer da cc. 250.

Nei giorni indicati nella tabella IV *b* (grafico IV *b*) si compirono insieme i prelevamenti dai palloncini e dagli Erlenmeyer.

A rigore non si sarebbero dovute usare beute, ma palloncini sferici identici a quelli dell'apparecchio agitatore, perchè, come già era dimostrato da Perotti, la forma del recipiente ha una qualche influenza sulla solubilizzazione.

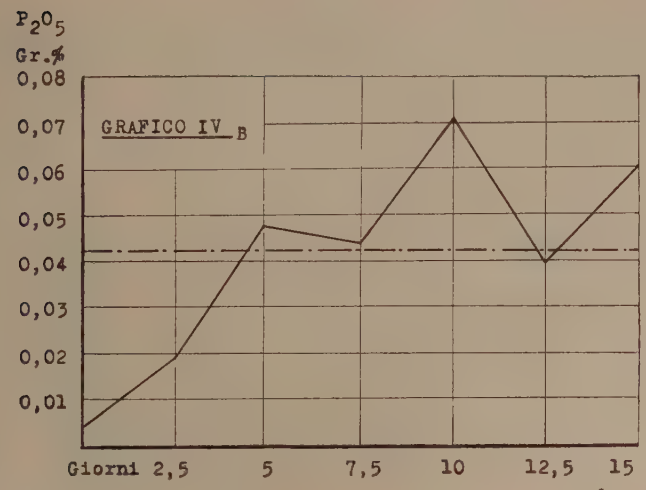
Confrontando fra loro le determinazioni eseguite su colture in Erlenmeyer, in palloni a fondo piatto ed in palloni a fondo sferico, Perotti trovò infatti che si aveva una scala il cui massimo era costituito dalla solubilizzazione in Erlenmeyer ed il minimo da quella in palloni sferici.

Ecco perchè si deve arguire che se la esperienza fosse stata condotta con recipienti dello stesso tipo di quelli della precedente, i risultati sarebbero stati più bassi e più marcata l'influenza dell'agitazione sulla curva del fenomeno.

Comunque i risultati ottenuti dimostrano che si ha una solubilizzazione massima (ricerca n. 62) inferiore del 18,1 % a quella precedente ed una solubilizzazione media inferiore alla precedente del 7,8 % (solubilizzazione massima 70,8 %, ricerca n. 62, solubilizzazione media 42,2 %).

TABELLA IV *b*.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
57	Iniziale	0.0044	4.6
58	»	0.0047	
59	2.5	0.0193	19.3
60	5 –	0.0475	47.5
61	7.5	0.0439	43.9
62	10 –	**0.0708**	**70.8**
63	12.5	0.0392	39.2
64	15 –	0.0602	60.2
Solubilizzazione media . . .		**0.0422**	**42.2**



Esperienza V *a*. — Furono proseguite in questa esperienza le ricerche di cui alle due esperienze precedenti inoculando i palloncini con 1 grammo di terra invece che con 1 cc. di stemperamento acquoso come in IV *a*.

I risultati furono quali si attendevano: la solubilizzazione del fosfato fu minore che nella esperienza precedente.

Ciò non deve meravigliare se si pensa che con uno stemperamento acquoso di 100–200 grammi di terra in altrettanta acqua, si ha un liquido in cui sono uniformemente ripartite le forme microbiche contenute nel terreno, ciò che non si ha invece prelevando direttamente un grammo di materiale dallo stesso terreno.

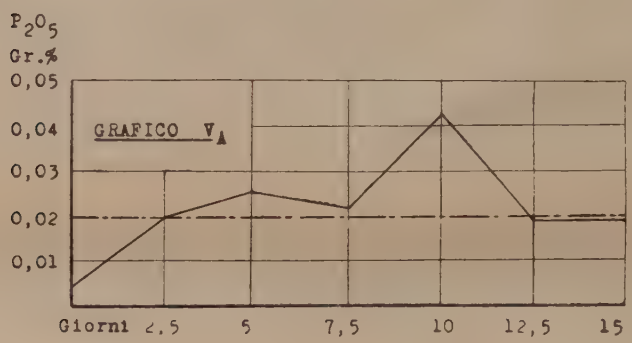
Queste, secondo il nostro modo di vedere, le ragioni per cui in questa esperienza vi fu una contrazione nell'intensità di solubilizzazione rispetto alla esperienza IV *a*.

I risultati delle analisi furono (tabella V *a* – grafico V *a*): solubilizzazione massima 42,5 % (ricerca n. 70); solubilizzazione media 20,1 %; quindi una diminuzione del 46,4 % nella prima e del 19,9 % nella seconda, rispetto alla esperienza IV *a* (ricerca n. 54).

Resta quindi accertato che lo stemperamento agisce, come materiale d'innesto, molto meglio che la terra. Ciò, nonostante si sia sostituito un centimetro cubo di stemperamento con un grammo di terra cioè con il doppio all'incirca di quella che compete ad un centimetro cubo di stemperamento stesso.

TABELLA V *a*.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
65	Iniziale	0.0048	4.6
66	»	0.0044	
67	2.5	0.0200	20
68	5 –	0.0256	25.6
69	7.5	0.0220	22
70	10 –	**0.0425**	**42.5**
71	12.5	0.0191	19.1
72	15 –	0.0188	18.8
Solubilizzazione media . . .		**0.0201**	**20.1**



E s p e r i e n z a V *a*. — La stessa prova parallela fatta per l'esperienza IV*a* fu ripetuta per la successiva, sempre con Erlenmeyer non agitati.

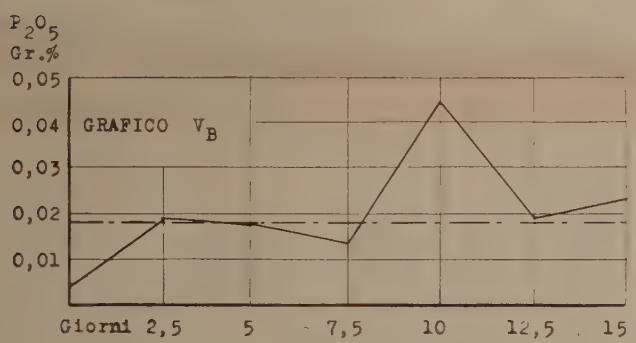
I risultati furono quali ci si doveva aspettare; più bassi che nelle tre esperienze che precedono. Ciò del resto è facile a comprendere in quanto si attendeva non altro che una conferma a quanto già era stato fissato: anzitutto al benefico effetto della agitazione ai fini dell'attività microbica di solubilizzazione, poi al minor rendimento del terreno asciutto di quello dello stemperamento, sulla solubilizzazione stessa.

Confrontando infatti la tabella V *b* ed il grafico V *b* con i tre precedenti si constata quanto si riferisce: la solubilizzazione massima scese a 44,7 (ricerca n. 78) con un decremento del 26,1 % rispetto alla V *a* ed un leggero aumento sulla IV *b* (2,2 %); la solubilizzazione media scese da 42,2 % (esperienza IV *b*) e da 20,1 % (V *a*) a 18,2 %.

Il *maximum* di solubilizzazione per tutte e quattro le esperienze si verificò al 10° giorno (ricerche nn. 54–62–70–78).

TABELLA V *b*.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
73	Iniziale	0.0048	4.6
74	»	0.0045	
75	2.5	0.0191	19.1
76	5 –	0.0172	17.2
77	7.5	0.0133	13.3
78	10 –	**0.0447**	**44.7**
79	12.5	0.0193	19.3
80	15 –	0.0235	23.5
Solubilizzazione media . . .		**0.0182**	**18.2**



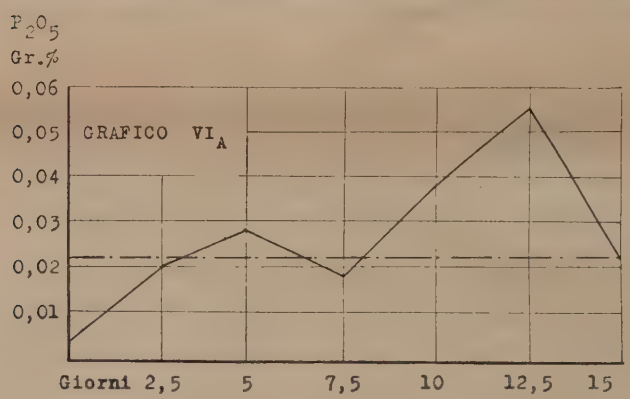
Esperienza VI *a*. — Si proseguirono ancora le ricerche sull'influenza della quantità di materiale di inoculazione. In questa esperienza, continuando pur sempre ad usare il liquido colturale di cui all'esperienza III, come substrato di coltura, fu aumentata la quantità di terra asciutta inoculata fino al doppio di quella immessa precedentemente, cioè a 2 grammi.

I risultati, esposti nella tabella VI *a* e nel grafico VI *a* non portano a modificazioni sostanziali da quelli della corrispondente esperienza eseguita precedentemente: leggero aumento della solubilizzazione media e di quella massima (ricerca n. 87) rispettivamente 2 % e 12,7 %.

Da notare piuttosto che la solubilizzazione massima si spostò in questa esperienza di due giorni e mezzo in ritardo. Le cause non sono facili a ricercarsi. Di una probabile causa si parlerà nella esperienza seguente.

TABELLA VI *a*.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
81	Iniziale	0.0046	4.6
82	2 –	0.0046	
83	2.5	0.0200	20 –
84	5 –	0.0281	28.1
85	7.5	0.0181	18.1
86	10 –	0.0382	38.2
87	12.5	**0.0552**	**55.2**
88	15 –	0.0222	22.2
Solubilizzazione media . . .		**0.0221**	**22.1**



Esperienza VI *b*. — È, questa, una terza prova diretta a dimostrare la favorevole influenza dell'agitazione sul processo dissolutivo del fosfato. Fu eseguita come le due precedenti, consimili, servendosi di Erlenmeyer non agitati, con liquido uguale a quello delle esperienze precedenti e con inoculazione di materiale terroso assolutamente identici per qualità e quantità a quella della esperienza parallela (VI *a*).

Non del tutto simili però furono i risultati (tabella VI *b* e grafico VI *b*) solubilizzazione media 14,6 %, massima 36,8 % (ricerca n. 94) ambedue inferiori

alle precedenti. Fin qui dunque nulla di nuovo in quanto si ha la logica e naturale conferma di un fatto già provato. Il fatto nuovo si verifica invece quando si considerino le due serie parallele di esperienze: IV*a*, V*a*, VI*a* e IV*b*, V*b*, VI*b*.

Prendendo ad osservare queste prove unitamente, è evidente un fatto: che la solubilizzazione massima ha, nella prima serie, l'andamento di una curva la cui concavità è volta verso l'alto ed il minimo è racchiuso tra due massimi, ciò che diviene naturale se si ammette la maggiore efficacia dell'inoculazione con stemperamento acquoso che con terreno asciutto, in quanto sostituendo una data quantità di stemperamento con la quantità corrispondente di terreno, si ha decremento nel fenomeno di solubilizzazione ed il contrario si ha aumentando progressivamente la quantità di terreno. Donde l'andamento suddetto per le tre esperienze considerate nell'ordine di successione in cui si son descritte.

Non sembra invece naturale la curva dei massimi della seconda serie di esperienze la quale presenta pure la concavità volta verso l'alto, ma ha il suo minimo ad un estremo.

Come mettere d'accordo i due fatti? Potrebbe forse pensarsi ad un errore analitico grossolano o all'accentuarsi di una delle cause di errore cui si è accennato in principio, nella ricerca relativa al massimo della esperienza VI *b* che è quella, diciamo così, fuori di posto; quella che dà un valore più basso di quello logicamente prevedibile.

Questo però è da escludersi in modo quasi assoluto in quanto l'identico fenomeno si verifica per le solubilizzazioni medie.

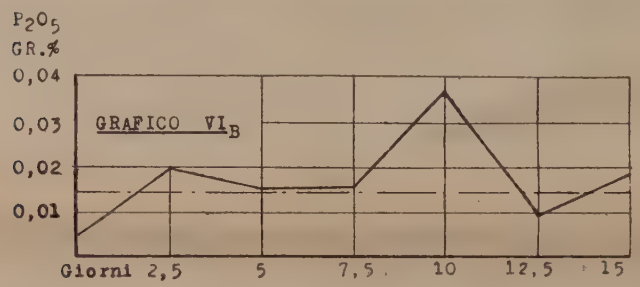
Pure il fatto deve avere una ragione: quello che abbiamo pensato è che, avendo normalmente usato per le inoculazioni un terreno contenente molta argilla (circa 25 %) sia da attribuire proprio a questa la causa del fatto verificatosi. In quanto l'argilla, nei recipienti non agitati, depositandosi lentamente sul materiale fosfatico adagiato sul fondo del recipiente, può aver disteso su di esso uno strato protettivo, molto aderente trattandosi di materiale colloidale, riducendone così notevolmente l'attacco microbico, per azione puramente meccanica. Ciò spiegherebbe perchè l'aumento di materiale di inoculazione porti ad una diminuzione sia della solubilizzazione massima che di quella media.

Nei recipienti agitati, invece, ciò non ha ragion d'essere in quanto non si ha deposito al fondo delle materie colloidali.

Ciò non ha, ripetiamo, un carattere di affermazione assoluta; è bensì una pura e semplice ipotesi su un fatto verificatosi sperimentalmente, mentre si aveva ragione di dover ritenere verosimile il fatto contrario.

TABELLA VI *b*.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
89	Iniziale	0.0045	4.6
90	»	0.0047	
91	2.5	0.0198	19.8
92	5 –	0.0155	15.5
93	7.5	0.0157	15.7
94	10 –	**0.0368**	**36.8**
95	12.5	0.0097	9.7
96	15 –	0.0180	18 –
Solubilizzazione media . . .		**0.0146**	**14.6**



Esperienza VII. — Stabilite ormai le linee generali dell'influenza della quantità di materiale di inoculazione e dell'agitazione dei recipienti di coltura, pur senza essere giunti al risultato che si voleva conseguire (solubilizzazione al 100 % del fosfato tricalcico), si passò ad uno studio più accurato dell'effetto delle due principali sorgenti carboidrate: glucosio e saccarosio.

Gli effetti della sostituzione dell'uno all'altro dei due zuccheri furono studiati nelle esperienze II e III; ora si volle indagare quale fosse il comportamento dei microbi del suolo, in relazione all'attacco dei minerali fosfatici insolubili, di fronte ad un miscuglio dei due zuccheri. L'inoculazione fu eseguita con 1 cc., di stemperamento.

glucosio . . . . . 15 – ‰
saccarosio . . . . . 7,5 »
solfato ammonico . . . . . 2 – »
P_2O_5 . . . . . 1 – »

I risultati, visibili nella tabella VII integrata dal relativo grafico, furono i seguenti per quel che riguarda i due dati da noi di solito presi in esame:

solubilizzazione media 0,0122; soluzione massima 0,0326 (ricerca n. 103).

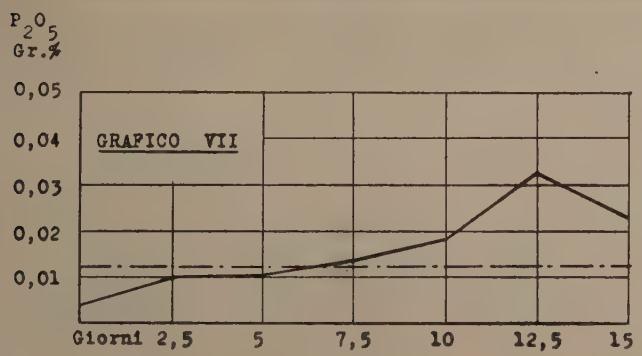
Per meglio chiarire il confronto tra le tre ricerche riportiamo uno specchio comparativo delle solubilizzazioni medie e massime riscontrate nelle tre esperienze:

	Esperienza		
	I	II	III
Solubilizzazione massima . . .	0,0592	0,0565	0,0326
» media	0,0348	0,0352	0,0122

Si ha dunque una netta azione deprimente dal miscuglio dei due carboidrati. Fenomeno stranissimo di cui non sappiamo renderci ragione.

TABELLA VII.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
97	Iniziale	0.0041	4 –
98	»	0.0040	
99	2.5	0.0098	9.8
100	5 –	0.0106	10.6
101	7.5	0.0130	13 –
102	10 –	0.0180	18 –
103	12.5	**0.0326**	**32.6**
104	15 –	0.0231	23.1
Solubilizzazione media . . .		**0.0122**	**12.1**



Esperienza VIII. — Si volle studiare quale potesse essere sulla esperienza precedente l'effetto prodotto da una maggior quantità di azoto ammoniacale.

Perciò si ripetè l'esperienza precedente nelle identiche condizioni di inoculazione, con il liquido colturale seguente:

glucosio	15 – ‰
saccarosio	7,5 »
solfato ammonico	4 – »
P_2O_5	1 – »

I risultati non furono quali si potevano attendere: leggero aumento della solubilizzazione media (dal 12,2 al 17,5 %), ma diminuzione di quella massima (dal 32,6, ricerca n. 103, al 30,2 %; ricerca n. 110).

Anche con questa serie di ricerche ci si trova di fronte a fatti che difficilmente possono trovare una spiegazione esauriente.

L'azione dell'aumento di $(NH_4)_2SO_4$ nella soluzione nutritiva, darebbe un risultato positivo passando dall'1 al 2 ‰ (esperienza I e II) e nulla dal 2 al 4 ‰ (esperienza VII e VIII). L'unica ipotesi che si possa formulare su questo fatto è, secondo noi, che l'*optimum* di concentrazione del sale suddetto sia tra l'1 ed il 2 ‰. Dal 2 ‰ in su essendosi sorpassata la concentrazione necessaria alla vita microbica nei palloncini di coltura, cioè, la quantità effettivamente consumata dai microrganismi, si ha indifferenza fino a che non si è raggiunta una concentrazione limite per la quale incominciano ad aversi disturbi fisiologici nelle colture.

Forse coltivando per un tempo superiore a quello delle nostre esperienze, si può avere un *optimum* di concentrazione di solfato ammonico leggermente superiore a quello trovato per le nostre condizioni, in quanto aumenta il consumo assoluto di azoto delle colture.

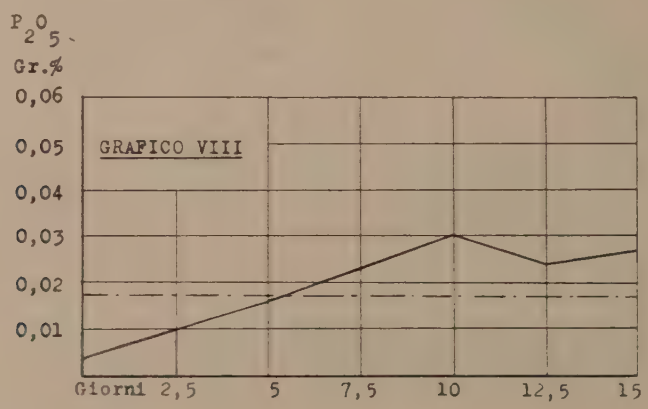


TABELLA VIII.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
105	Iniziale	0.0042	4 –
106	»	0.0037	
107	2.5	0.0102	10.2
108	5 –	0.0156	15.6
109	7.5	0.0225	22.5
110	10 –	0.0302	30.2
111	12.5	0.0238	23.8
112	15 –	0.0267	26.7
Solubilizzazione media . . .		0.0175	17.5

Esperienza IX. — Considerato non potersi anche raggiungere una solubilizzazione considerevolmente elevata, si volle di nuovo sperimentare l'aggiunta di saccarosio, nelle condizioni però della esperienza precedente.

Il liquido colturale usato fu perciò il seguente:

saccarosio . . . . . 15 ‰
solfato ammonico . . . . . 4 »
P_2O_5 . . . . . 1 »

I risultati di queste ricerche, espressi dalla tabella IX e dal grafico IX, sono naturalmente da confrontarsi con quelli dell'esperienza precedente. Dal confronto risulta un notevole miglioramento: la solubilizzazione massima sale dal 30,2 % (ricerca n. 110) al 45,8 % (ricerca n. 117) e quella media dal 17,5 al 31,7 %.

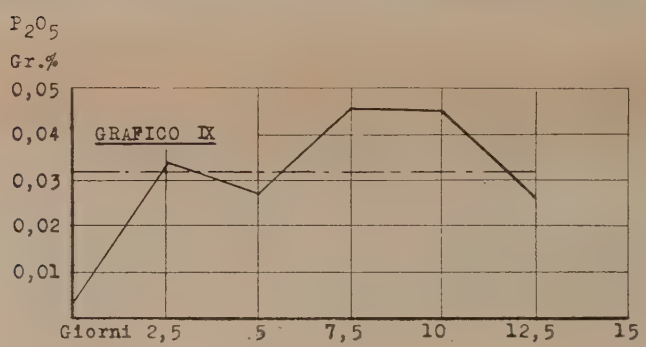
Non c'è che da accettare i fatti quali sono: per trovare una spiegazione del fenomeno occorrerebbe, a nostro parere, tutta una lunga serie di esperienze nelle quali, partendo da un liquido colturale contenente come alimento carboidrato solamente saccarosio, si passasse gradatamente ad un liquido contenente glucosio e saccarosio in parti uguali e da questo, sempre per gradi, ad un altro contenente solamente glucosio. Occorrerebbe inoltre saggiare periodicamente i diversi liquidi per conoscere ad ogni istante qual'è la quantità di zucchero invertito presente e quale la quantità di quello non invertito. Si potrebbe allora giungere a stabilire anzitutto quale miscuglio sia il più adatto alla vita microbica; in secondo luogo, come vari nelle colture il titolo zuccherino; infine, come si susseguano nel tempo

le utilizzazioni, meglio le demolizioni dei due carboidrati presenti nelle soluzioni nutritive.

Con un quadro completo quale noi abbiamo descritto si potrebbe forse giungere ad una spiegazione dei fatti suesposti.

TABELLA IX.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
113	Iniziale	0.0040	4 –
114	»	0.0040	
115	2.5	0.0343	34.3
116	5 –	0.0272	27.2
117	7.5	**0.0458**	**45.8**
118	10 –	0.0455	45.5
119	12.5	0.0258	25.8
120	15 –	—	—
Solubilizzazione media . . .		**0.0317**	**31.7**



Esperienza X. — È uno studio analogo al precedente, volto a dimostrare: 1° se anche il glucosio somministrato da solo sia più efficace del miscuglio glucosio–saccarosio; 2° se i risultati dell'esperienza VIII relativa alla maggiore concentrazione della soluzione nutritiva in solfato ammonico, valgano anche per soluzioni contenenti solo glucosio oltre che per quelle contenenti il miscuglio suddetto.

Perciò nel liquido colturale precedente si sostituì il saccarosio con il glucosio raddoppiandone le dosi e si condusse l'esperienza nelle stesse condizioni della precedente.

Liquido colturale:

glucosio	30 %
solfato ammonico	4 »
P_2O_5	1 »

Si fece l'inoculazione con 1 cc. di stemperamento.

I risultati di queste prove vanno confrontati, per analogia di condizioni, con quelli della esperienza IV *a* dalla quale differisce solo per la concentrazione del solfato ammonico; con la VIII e con la IX dalle quali differisce soltanto per la qualità e quantità dello zucchero immesso.

Riportiamo nella tabella X e nel grafico X i risultati della presente esperienza e nello specchio seguente le solubilizzazioni medie e massime delle esperienze sopra citate.

	Esperienza			
	IV glucosio 30 °/₀₀ solf. amm. 2	VIII gluc. 15 + sac. 7,5 solf. amm. 4	IX sacc. 15 solf. amm. 4	X gluc. 30 solf. 4
solubilizzazione massima	0,0889	0,0302	0,0458	0,0478
» media. .	0,0500	0,0175	0,0317	0,0400

Da queste cifre risultano chiaramente le seguenti deduzioni:

1° L'aumento del solfato ammonico dal 2 al 4 °/₀₀ è manifestamente dannoso: segno evidente che si è oltrepassato quel limite di concentrazione oltre il quale non è consigliabile spingersi;

2° Che la sostituzione del miscuglio tra il mono e il disaccaride sperimentati con glucosio puro porta ad un notevolissimo incremento della solubilizzazione del fosfato tricalcico;

3° Che la sostituzione del glucosio puro al saccarosio puro porta anch'essa, nelle condizioni sperimentate, ad un incremento di solubilizzazione.

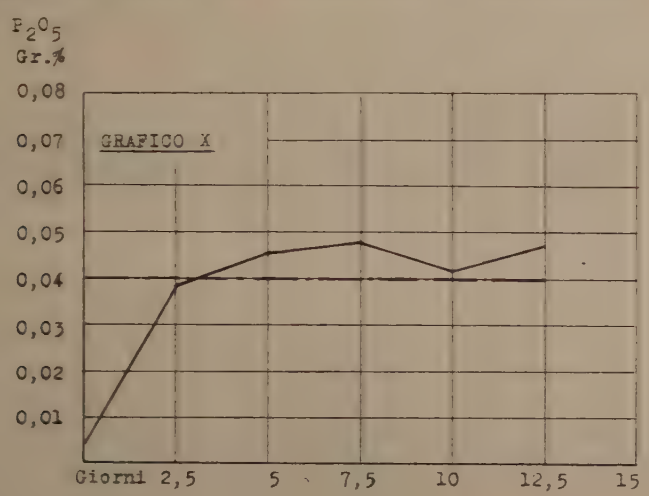


TABELLA X.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
121	Iniziale	0.0040	4 –
122	»	0.0041	
123	2.5	0.0383	38.3
124	5 –	0.0455	45.5
125	7.5	**0.0478**	**47.8**
126	10 –	0.0414	41.4
127	12.5	0.0472	47.2
128	15 –	—	—
Solubilizzazione media . . .		**0.0400**	**40.0**

Esperienza XI. — Constatatosi nelle ricerche precedenti un notevole abbassamento della curva di solubilizzazione nel passaggio dalla concentrazione del 2 ‰ a quella al 4 ‰ di $(NH_4)_2$ si volle indagare sull'effetto delle concentrazioni intermedie.

Allestimmo perciò un substrato della seguente composizione:

glucosio	30 ‰
solfato ammonico	3 »
P_2O_5	1 »

e con esso ripetemmo le ricerche precedenti inoculando ciascun palloncino con cc. 1 di stemperamento, come in IV *a*.

Fu voluto inoltre determinare il tempo entro il quale il glucosio inizialmente presente nel substrato fosse completamente demolito per attività microrganica. Perciò furono eseguite ogni giorno ricerche qualitative del glucosio nel liquido colturale. Si vide che al 5° giorno di coltura non ce ne era più traccia: fu aggiunto ancora il 10 % di glucosio e continuato a saggiare giornalmente il liquido. Al 12° giorno di coltura non si rinvenne più il glucosio nuovamente aggiunto.

Contemporaneamente venivano fatte ogni due giorni e mezzo, come per le esperienze precedenti, le determinazioni del fosforo.

Si osservò in tal modo che non si determina una solubilizzazione proporzionale alla quantità di zucchero demolito ed utilizzato dalle colture: mentre al 2° giorno era stato consumato carboidrato nella quantità del 12 ‰, la solubiliz-

zazione, in quello stesso giorno, fu del 13,4 % (ricerca n. 131), dopo due giorni e mezzo la solubilizzazione salì al 18,7 % (ricerca n. 132) ed il consumo di carboidrato al 30 ‰; al 12° giorno e mezzo la solubilizzazione toccò il massimo col 53,7 % (ricerca n. 135) e l'utilizzazione del carboidrato si portò al 40 ‰.

In conclusione: mentre nei primi due giorni e mezzo le curve di solubilizzazione del fosforo e di consumo di carboidrato sono pressochè parallele, dal 2° al 5° giorno la prima tende ad una orizzontale mentre la seconda sale molto più rapidamente: il contrario avviene tra il 5° ed il 12° giorno.

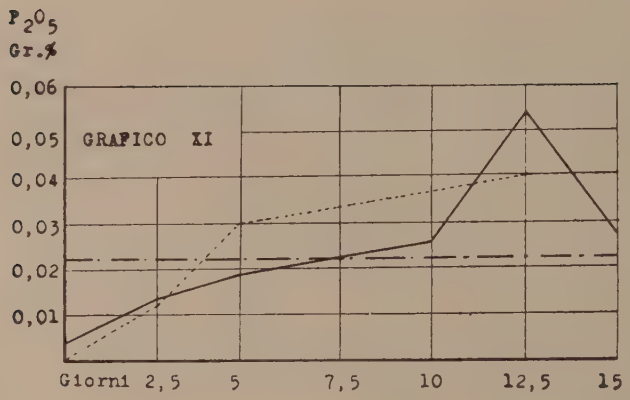
Questo fatto ci suggerì di variare le quantità di glucosio nelle esperienze successive.

I risultati di questa esperienza sono riportati nella tabella XI e nel grafico XI nel quale è riportata anche la curva del consumo di zucchero, con una linea tratteggiata. Per questa curva le ordinate si son poste uguali a quelle della curva di solubilizzazione ed indicano i grammi di carboidrato consumato per cc. 1 di soluzione nutritiva anzichè per 100 come le precedenti; la scala di solubilizzazione di P_2O_5 sta quindi a quella di utilizzazione del carboidrato come 1 : 100.

La solubilizzazione media fu del 22,5 %.

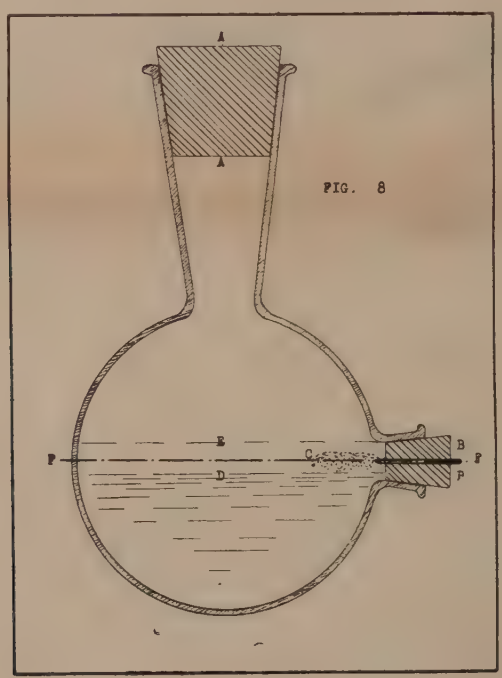
TABELLA XI.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
129	Iniziale	0.0044	4.2
130	»	0.0040	
131	2.5	0.0134	13.4
132	5 –	0.0187	18.7
133	7.5	0.0219	21.9
134	10 –	0.0255	25.5
135	12.5	**0.0537**	**53.7**
136	15 –	0.0270	27.0
Solubilizzazione media . . .		**0.0225**	**22.5**



6. – *Modificazioni dell'apparecchio ed altre esperienze.*

Gli inconvenienti presentati dall'apparecchio primitivo e dai palloncini usati fino alla esperienza XI ci consigliarono a questo punto di apportarvi delle modificazioni.



Ad ogni esperienza qualche palloncino scoppiava o si apriva per effetto della pressione interna. D'altra parte il mantenere anche per la durata di

12–14 ore la CO_2 sotto pressione nei palloncini, poteva portare a diversità di condizioni da esperienza ad esperienza, ciò che si volle evitare.

Per ovviare a tali inconvenienti ricorremmo a palloni speciali, sempre sferici, ma della capacità di 500 cc. muniti di una apertura laterale, rappresentati in sezione dalla fig. 8; cioè palloni raccoglitori da distillazione. Il palloncino fu chiuso a tenuta nella sua apertura normale del collo dal tappo di gomma (A). L'apertura laterale invece fu chiusa con un tappo di gomma (B) attraversato da una sottilissima canna di vetro (C) piegata a serpentino nella estremità interna del palloncino.

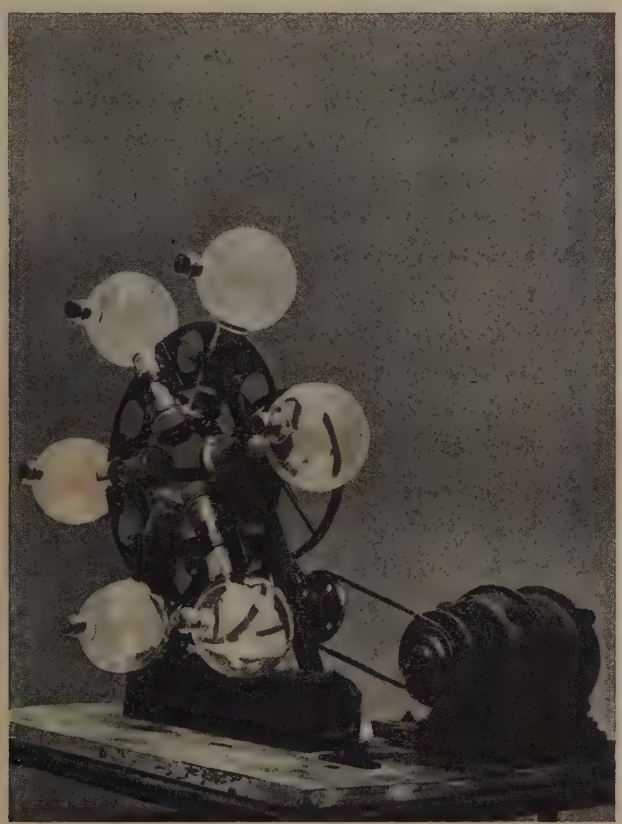


Fig. 9.

Dell'apparecchio agitatore fu cambiato solo il porta–palloncini facendolo più grande e con scanalature radiali più profonde in relazione alla diversità dei recipienti.

Il montaggio dei palloncini, come si vede dalla fotografia (fig. 9), non differisce da quello dei palloncini precedenti che per il fatto di essere obbligati a man-

tenere l'asse FF della fig. 8 in posizione esattamente perpendicolare al piano di rotazione; condizione, questa, necessaria e sufficiente a che il liquido non raggiunga mai, durante un'intera rotazione del palloncino, il tubetto a spirale C ma si mantenga ad un livello inferiore (D) in posizione normale e ad un livello superiore (E) in posizione rovescia. Il volume massimo di liquido colturale contenuto dal palloncino in tali condizioni è di circa cc. 220.

Dopo aver apportato queste modificazioni all'apparecchio, furono ripresi gli studi con la esperienza XII.

Esperienza XII. — Nel riprendere le esperienze fu basata la composizione del substrato sui risultati delle ricerche precedenti assumendo come punto di partenza quella da cui si erano ottenuti i migliori risultati, cioè, la composizione del liquido colturale della esperienza IV *a* (ricerca n. 54) modificato in base ai risultati della ultima esperienza relativamente a quel che riguarda la quantità di glucosio:

glucosio . . . . 40 ‰
solfato ammonico 2 »
P_2O_5 . . . . . 0,5 ‰ = gr. 0,2405 di $Ca_3(PO_4)_2$ in 220 cc. di liquido.

Inoculazione: cc. 1 di stemperamento.

Come si vede, fu variata anche la quantità di P_2O_5 introdotta in ciascun palloncino per cercare di giungere alla solubilizzazione totale.

I risultati furono ben lontani da quelli attesi in quanto nella esperienza citata si giunse come *maximum* all'88,9 % (ricerca n. 54) mentre nella presente si toccò appena il 35,2 %.

Essi sono esposti nella tabella XII e nel grafico XII: il *maximum* di solubilizzazione fu riscontrato al 10° giorno con il 35,2 % (ricerca n. 141) e la solubilizzazione fu del 23,4 %.

Anche di questo fatto non è facile trovare una spiegazione poichè non è possibile di pensare ad un'azione di fattore limitante esercitata dall'anidride fosforica, in quanto il fosfato tricalcico non era del tutto utilizzato, nè d'altra parte è ammissibile che vi potesse essere un dannoso eccesso di carboidrato, ove si tenga conto dei risultati della esperienza seguente.

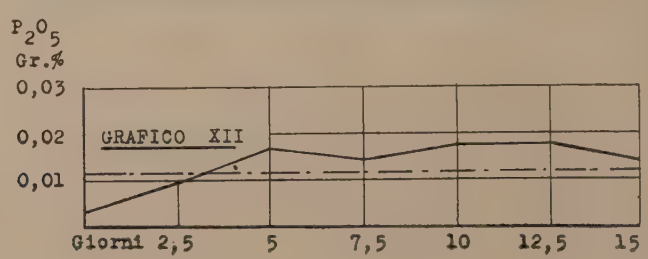


TABELLA XII.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
137	Iniziale	0.0032	6.4
138	2.5	0.0093	18.6
139	5 –	0.0167	33.4
140	7.5	0.0142	28.4
141	10 –	**0.0176**	**35.2**
142	12.5	0.0173	34.6
143	15 –	0.0140	28 –
Solubilizzazione media . . .		**0.0116**	**23.2**

Esperienza XIII. — È analoga alla precedente: unica differenza l'ulteriore aumento del glucosio nel substrato, il quale risultò della seguente composizione:

glucosio . . . . . 50 ‰
solfato ammonico . . . . . 2 »
P_2O_5 . . . . . 0,5 »

L'inoculazione fu fatta come precedentemente.

I risultati son consegnati nella tabella XIII e nel grafico XIII. La solubilizzazione massima fu del 53,8 % (ricerca n. 148) e quella media del 18,7 %.

Qui cade acconcio, come altrove, mettere direttamente a raffronto i risultati di tre esperienze che differiscono tra loro per un solo elemento:

	Esperienza		
	IV *a* glucosio 30 ‰	XII glucosio 40 ‰	XIII glucosio 50 ‰
Solubilizzazione massima . .	0,0887	0,0176	0,0269
» media . . .	0,0500	0,0117	0,0187

Per riportare però l'anidride fosforica alla stessa concentrazione è meglio servirsi direttamente delle percentuali:

	Esperienza		
	IV *a*	XII	XIII
Solubilizzazione massima . .	88.7 %	35,2 %	53,8 %
» media . . .	50 – »	23,4 »	37,4 »

Non è agevole mettere d'accordo i risultati di queste tre esperienze; e meno agevole ancora il trovare una spiegazione ai fatti. Non è possibile che col 40 ‰ di glucosio si sia giunti alla concentrazione limite di questo zucchero, perchè col 50 ‰ cresce sia il *maximum* che la media di solubilizzazione; d'altra parte la generale diminuzione di questi due fattori, nelle ultime due esperienze citate, dimostra che qualcosa è intervenuto a modificare le condizioni di esperienza.

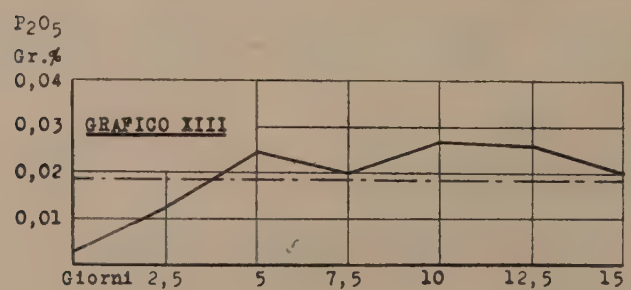
Unico fatto che porti una spiegazione al fenomeno verificatosi è la diversa stagione in cui furono compiute le esperienze: la IV *a* nel colmo dell'estate, le altre due nel colmo dell'inverno. Ha avuto, questo, importanza decisiva per la solubilizzazione assolutamente eccezionale verificatasi nella esperienza IV *a* ?

Nulla di improbabile nè di inverosimile in quanto la variazione stagionale del contenuto batterico del terreno può avere avuto un forte peso sui risultati di tutte le esperienze.

Era d'altronde un fatto inevitabile e non facilmente controllabile.

TABELLA XIII.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
144	Iniziale	0.0031	6.2
145	2.5	0.0127	25.4
146	5 –	0.0245	49 –
147	7.5	0.0200	40 –
148	10 –	**0.0269**	**53.8**
149	12.5	0.0262	52.4
150	15 –	0.0204	40.8
Solubilizzazione media . . .		**0.0187**	**37.4**



Esperienza XIV. — Con la presente e la susseguente esperienza si volle studiare l'andamento della solubilizzazione del fosfato tricalcico a diverso stato fisico di aggregazione.

Mentre nelle esperienze precedenti si era usato un miscuglio omogeneo di materiali fosfatici di diversa finezza, nella esperienza di cui riferiamo si usò solamente materiale capace di passare attraverso uno staccio a maglie quadrate di mm. 0,10 di lato.

Il substrato, e le altre condizioni di esperimento furono le stesse della esperienza precedente: le analisi furono arrestate al 12° giorno di coltura.

I risultati ottenuti furono (tabella XIV e grafico XIV) i seguenti:

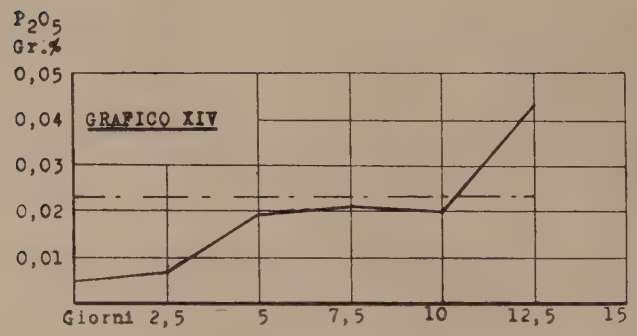
solubilizzazione massima . . . . . 86,4 % (ricerca n. 156)
» media . . . . . 34,2 »
» iniziale . . . . . 4,9 » (ricerca n. 151)

La solubilizzazione massima ebbe un notevole incremento su quella della esperienza precedente (32,6 %); poco sensibile invece l'andamento del livello medio di solubilizzazione.

Ciò dimostra una volta di più che ha forte peso, sulla solubilizzazione dei fosfati insolubili per attività batterica, lo stato di aggregazione della materia.

TABELLA XIV.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
151	Iniziale	0.0049	9.8
152	2.5	0.0068	13.6
153	5 –	0.0192	38.4
154	7.5	0.0209	41.8
155	10 –	0.0198	39.6
156	12.5	**0.0432**	**86.4**
157	15 –	—	—
Solubilizzazione media . . .		**0.0229**	**45.8**



Esperienza XV. — A dimostrare quanto si è asserito fu compiuta un'altra esperienza, impiegando come sorgente fosfatica il fosfato tricalcico usato per le altre esperienze, ma in granuli di diametro compreso tra mm. 0,40 e mm. 0,19.

Null'altro fu cambiato dalla precedente esperienza.

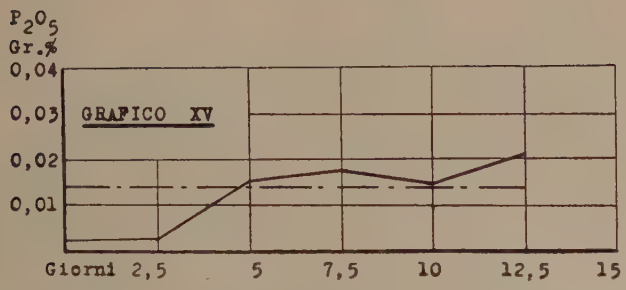
I risultati sono esposti nella tabella XV e nel grafico XV.

La solubilizzazione massima scese al 62,4 % (ricerca n. 163) al 12° giorno, la iniziale al 2,4 % (ricerca n. 158) e la media al 14 %.

I risultati concordano con quelli delle esperienze precedenti e si conclude quindi per la netta azione favorevole della suddivisione del fosfato sulla sua solubilizzazione per attacco microbico.

TABELLA XV.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 Disciolta Grammi	% P_2O_5
158	Iniziale	0.0024	4.8
159	2.5	0.0027	5.4
160	5 –	0.0154	30.8
161	7.5	0.0177	35.4
162	10 –	0.0149	29.8
163	12.5	**0.0312**	**62.4**
164	15 –	—	—
Solubilizzazione media . . .		**0.0140**	**28** –



Esperienza XVI. — Altro fattore del quale si volle studiare l'effetto fu la reazione del mezzo.

A questo scopo si allestirono i sei palloncini con il liquido colturale, di cui all'esperimento precedente, il cui pH fu trovato pari a 4,1. Poi, a cominciare dal palloncino n. 2, si aggiunsero crescenti quantità (pochi centimetri cubi), di soluzione molto diluita di K_2CO_3, in modo da formare tutta una scala di reazioni dal pH 4 circa, al 9.

Dopo di che furono inoculati i liquidi stessi e si coltivarono in termostato come nelle esperienze precedenti.

Le determinazioni furono eseguite al 5° ed al 10° giorno di coltura.

I risultati conseguiti (tabella XVI e grafico XVI) dimostrano che la reazione più adatta a raggiungere il massimo è compresa fra pH 8 e pH 9.

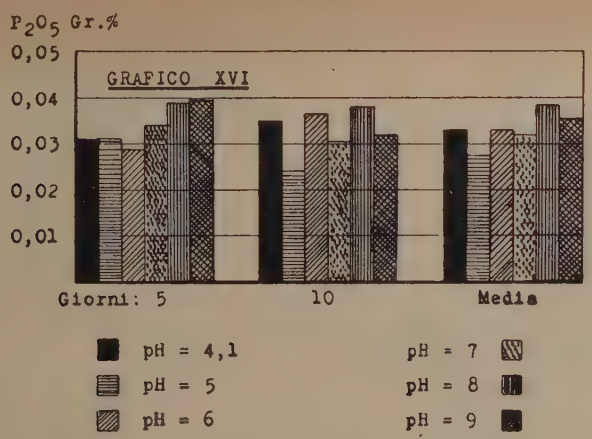


TABELLA XVI.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta nei substrati con											
		pH = 4,1		pH = 5		pH = 6		pH = 7		pH = 8		pH = 9	
		Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%
165–170	5	0.0308	61.6	0.0310	62 –	0.0290	58 –	0.0341	68.2	0.0388	77.6	0.0394	78.8
171–176	10	0.0351	70.2	0.0239	47.8	0.0366	73.2	0.0304	60.8	**0.0379**	75.8	0.0319	63.8
Medie		0.0329	65.8	0.0274	54.8	0.0328	65.6	0.0322	64.4	**0.0383**	76.6	0.0356	71.2

7. – *Osservazioni e fissazione del metodo.*

Dalle esperienze precedenti si possono trarre le seguenti conclusioni:

1° La concentrazione dell'1 ‰ di solfato ammonico ha scarsa efficacia sulla solubilizzazione dei fosfati insolubili (Esperienza I, ricerche nn. 3–14);

2° La concentrazione doppia della precedente conduce a risultati notevolmente superiori (Esp. II, ricerche nn. 27–28);

3° Concentrazioni superiori al 2 ‰ dello stesso sale, deprimono l'attività solvente dei microrganismi (Esp. VIII, ricerche nn. 107–112; esp. IX, ricerche nn. 115–119; esp. XI, ricerche nn. 131–136);

4° Il 15 ‰ di saccarosio ed il 30 ‰ di glucosio hanno quasi lo stesso effetto sulle colture batteriche in rapporto alla solubilizzazione dei fosfati. (Esp. II, ricerche nn. 19–32; esp. III, ricerche nn. 35–48);

5° Il miscuglio dei due carboidrati nelle quantità, di ciascuno, pari a metà delle sopraindicate, ha azione minore, sull'attività batterica, che uno solo dei due zuccheri (Esp. VII, ricerche nn. 99–104; esp. IX, ricerche nn. 115–119; esp. X, ricerche nn. 123–127);

6° Concentrazioni crescenti di glucosio aumentano (entro certi limiti ed in certe determinate condizioni) la solubilizzazione degli elementi minerali. (Esp. XII, ricerche nn. 138 a 143; esp. XIII, ricerche nn. 144–150);

7° I granuli di fosfato tricalcico sono attaccati dai batteri con intensità inversamente proporzionale ai loro diametri. (Esp. XIV, ricerche nn. 152-156; esp. XV, ricerche nn. 159–165);

8° La reazione iniziale del substrato influisce sull'attività dissolutiva dei batteri e l'*optimum* si ha con reazione leggermente alcalina: pH 8 (Esp. XVI, ricerche nn. 169–175);

9° L'agitazione agisce biologicamente sulla solubilizzazione dei fosfati con molta intensità (Esp. IV *a*–IV *b*–V *a*–V *b*–VI *a*–VI *b*; ricerche nn. 49–96);

10° La stessa agisce molto lievemente per azione puramente meccanica. (Esp. I, ricerche nn. 15–16; esp. II, ricerche nn. 31–32; esp. III, ricerche nn. 47–48);

11° Il materiale usato per la inoculazione influisce per qualità e quantità nelle condizioni sperimentate, avendosi l'*optimum* con 1 cc. di stemperamento acquoso $^1/_1$ di terreno.

Il metodo, quindi, per la determinazione dell'assimilabilità dei fosfati insolubili, tenute presenti le circostanze suesposte, può essere fissato nei termini seguenti:

a) *Agitazione delle colture.* – È da prolungarsi per almeno 10 ore al giorno, per 10 giorni consecutivi, in apparecchio simile a quello descritto e con recipienti analoghi.

b) *Liquido colturale.* – Composizione:

Glucosio	50 –
Solfato ammonico	2 –
Fosfato in esame	0,5 di P_2O_5
Solfato di magnesio	0,1
Solfato di manganese	0,1
Cloruro ferrico	0,1
Cloruro sodico	tr.
Solfato potassico	tr.
Acqua distillata su vetro	1000 –

Volume cc. 220.

c) *Determinazione della* P_2O_5 *disciolta.* – Al quinto e al decimo giorno.

d) *Materiale d'inoculazione.* – Cc. 1 di stemperamento acquoso $^1/_1$ di gr. 100 di terreno, possibilmente prelevato dal terreno stesso di cui si vuole accertare il potere assimilante per i diversi fosfati.

e) *Procedimento analitico.* – Quello indicato all'inizio del presente studio.

f) *Stato fisico del materiale fosfatico.* – Granuli di diametro inferiore a mm. 0,1.

g) *Controllo.* – Termine di confronto per l'indice di assimilabilità sarà il fosfato tricalcico purissimo del quale deve determinarsi la solubilizzazione nella stessa esperienza ed alle identiche condizioni degli altri materiali fosfatici.

h) *Interpretazione dei risultati.* – Il risultato della determinazione eseguita al 5° giorno di coltura indica la prontezza e facilità di attacco maggiore o minore (in rapporto sempre al fosfato tricalcico) del materiale in esame. La solubilizzazione ottenuta al decimo giorno stabilisce invece la facilità di solubilizzazione del materiale, e la solubilizzazione media stabilisce appunto l'intensità media con cui si verifica l'attacco batterico.

8. – *Determinazione, con il metodo fissato, dell'assimilabilità di diversi fosfati.*

Nelle condizioni determinate precedentemente furono eseguite prove di assimilabilità di diversi materiali fosfatici.

I diversi fosfati furono analizzati per stabilire esattamente il titolo, e le medie dei risultati delle analisi in doppio sono riportati nella seguente:

Tabella delle analisi dei materiali fosfatici impiegati.

Ricerca N.	Campione di materiale fosfatico analizzato		P_2O_5 %
	N.	Nome e luogo di provenienza	
178–179	1	Fosfato tricalcico puro «Merk» Darmstad (Germania) . .	45.74
180–181	2	Perfosfato minerale del commercio	14.60
182–183	3	Perfosfato minerale del commercio	15.05
184–185	4	Perfosfato d'ossa del commercio (azoto 0.98 %)	19.85
186–187	5	Scorie Thomas del commercio	17.10
188–189	6	Fosforite «Italia» di Kosseir (Egitto – Africa)	33.20
190–191	7	» di Tunisia (Africa)	28.83
192–193	8	» del Marocco (Africa)	37.64
194–195	9	» del Marchallinschen	43.76
196–197	10	» Gran Concordia	31.66
198–199	11	» del Tennessee	35.72
200–201	12	» del Curaçao	32.66
202–203	13	» di Haiger Nassau.	17.76
204–205	14	» del Limburg.	32.60
206–207	15	» dell'Amberg	32.12
208–209	16	» di Gapsa (Algeria – Africa)	29.43
210–211	17	» di Land Pebble (Florida – Nord – America) . . .	31.27

Esperienza XVII. — Fu determinato in questa esperienza l'indice di assimilabilità di due perfosfati del commercio.

Veramente il metodo non è studiato per la determinazione di assimilabilità di fosfati semi-solubili, quali i perfosfati, per ragioni che vedremo nell'esporre i risultati della presente esperienza. Ciononostante si volle ugualmente compiere questa esperienza anche per trarne altre conclusioni di cui in seguito.

I risultati conseguiti nella determinazione in doppio, sono dati nella tabella XVII e nel grafico XVII.

Da essi si può dedurre anzitutto che i perfosfati erano inizialmente quasi del tutto solubili nel substrato: 80,6 % il primo (ricerche n. 213 e 216) e 81,2 % il secondo (ricerche n. 214 e 217); cioè solubilità di oltre i $^4/_5$ mentre la solubilità del fosfato tricalcico era appena di $^1/_{12}$ (ricerche n. 212 e 215).

La solubilizzazione del fosfato tricalcico si portò al quinto giorno (ricerche n. 218 e 211) al 22 % con un aumento dell'11,4 % mentre nel primo perfosfato

si ebbe un aumento del 3,8 % ($^1/_3$ del precedente) (ricerche n. 219 e 222) e nel secondo un aumento dell'8,4 ($^2/_3$ del precedente) (ricerche n. 220 e 223).

Al 10° giorno l'aumento del fosfato tricalcico fu del 28 % (ricerche n. 224 e 227) nel prino perfosfato del 7,4 % (ricerche n. 225 e 228) e cioè $^1/_4$ del precedente e nel secondo del 10,8 % (ricerche n. 226 e 229) e cioè i $^2/_5$ del fosfato tricalcico.

Come si vede nella presente esperienza con perfosfati, non fu raggiunto il 100 % di solubilizzazione sebbene si partisse da materiali solubili inizialmente nella misura dell'80 % ed oltre.

La spiegazione di questo fatto va ricercata nella notevole acidità introdotta nelle colture col perfosfato. Le determinazioni acidimetriche compiute nei liquidi di coltura all'inizio ed alla fine della esperienza dettero i risultati riportati nella tabella XVII dalla quale si riscontra come vi fu una forte variazione nella concentrazione idrogenionica del liquido contenente fosfato tricalcico, dall'inizio alla fine dell'esperienza (da pH 5,1 a pH 3,3) mentre rimase assolutamente costante nei liquidi contenenti perfosfati. Per questi l'acidità del mezzo fu il fattore che limitò la solubilizzazione.

Questo fatto si potè anche constatare macroscopicamente nei liquidi di coltura in quanto, mentre i prodotti di filtrazione dei substrati contenenti fosfato tricalcico si presentavano, al 10° giorno, lattescenti per il forte sviluppo microbico, gli altri erano appena opalini.

Indizio questo di maggior numero di microrganismi nei primi che nei secondi.

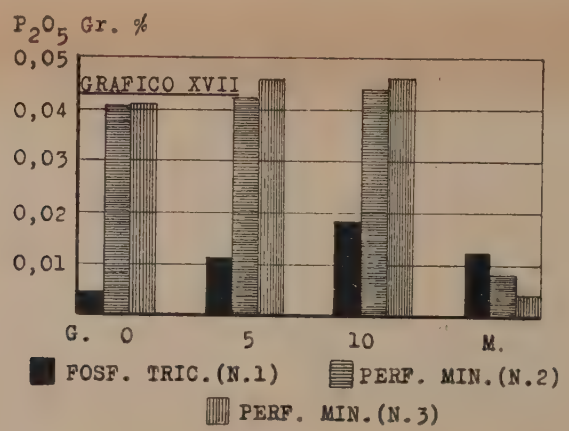


TABELLA XVII.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta nel					
		Fosfato tricalcico		Fosfato min. A		Perfosfato min. B	
		Assol. gr.	Media %	Assol. gr.	Media %	Assol. gr.	Media %
212–214	Iniziale	0.0042	8.6	0.0400	80.6	0.0410	81.2
215–217	»	0.0044		0.0406		0.0402	
218–220	5 –	0.0120	22 –	0.0442	84.4	0.0480	89.6
221–223	5	0.0118		0.0402		0.0416	
224–226	10	0.0198	36.6	0.0392	88 –	0.0478	92 –
227–229	10	0.0254		0.0508		0.0426	
Solubilizzazione media		0.0125	25 –	0.0083	16.6	0.0044	8.8
PH Iniziale		5.1		2.7		2.9	
PH Finale		3.3		2.7		2.9	

Esperienza XVIII. — Nella presente esperienza si determinò l'assimilabilità di un fosfato d'ossa e di un campione di scorie Thomas in confronto sempre al fosfato tricalcico.

Il perfosfato d'ossa conteneva 0,98 % di azoto; la quantità di azoto introdotta in ciascun palloncino con il materiale fosfatico risultò quindi di gr. 0,027 circa e cioè del 6,4 % in più che nei substrati contenenti fosfato tricalcico. L'aumento non fu così sensibile da apportare notevoli differenze alla solubilizzazione dei due fosfati anche perchè di non facile o pronta assimilazione.

I risultati ottenuti, esposti nella tabella XVIII e nel grafico XVIII, dimostrano:

1° Che la solubilità iniziale dei tre fosfati nel substrato fu notevole per il perfosfato (ricerche nn. 231–234) e lievissima per gli altri due (ricerche n. 230 e 233; 232 e 235);

2° Che al 5° giorno di coltura la solubilizzazione del perfosfato fu quasi completa (ricerche n. 239 e 240) mentre fu del 67,8 % nelle scorie (ricerche n. 238 e 241);

3° Al 10° giorno la solubilizzazione del perfosfato fu totale (ricerche nn. 243 e 246) mentre quella della scoria raggiunse l'84 % (ricerche n. 244 e 247) e quella del fosfato tricalcico raggiunse il 79,2 % (ricerche nn. 242 e 245).

4° La solubilizzazione media toccò il massimo nella scoria (69 %); non fu molto elevata nel fosfato tricalcico (36,6 %) e fu quasi la stessa per il perfosfato (37, 2 %).

I risultati ottenuti dal perfosfato non possono essere valutati più di quel tanto che valgono realmente: trattasi di un materiale notevolmente solubile nel substrato, per il quale, ripetiamo, non è studiato il metodo. Il fatto stesso di esser giunti alla solubilizzazione totale, dice che se altro perfosfato fosse stato aggiunto forse si sarebbe solubilizzato innalzando così la solubilizzazione media.

Ad ogni modo furono ripetute in questa esperienza le determinazioni del pH iniziale e finale (vedi tabella XVIII).

Risultò che il pH delle colture con perfosfati fu molto basso (in senso assoluto) e si mantenne costante dal principio alla fine dell'esperienza; quello del substrato con fosfato tricalcico fu più elevato e si abbassò notevolmente nel corso dello studio; quello dei liquidi con scorie fu più elevato ancora del precedente e subì un abbassamento anche più marcato.

Parallelamente l'osservazione dei prodotti di filtrazione dei liquidi colturali ci indicò uno sviluppo minimo nelle colture con perfosfato (liquido appena opalino), notevolmente superiore in quelle con fosfato tricalcico (liquido appena lattescente) e di gran lunga maggiore in quelle con scoria (liquido denso e biancastro simile al latte).

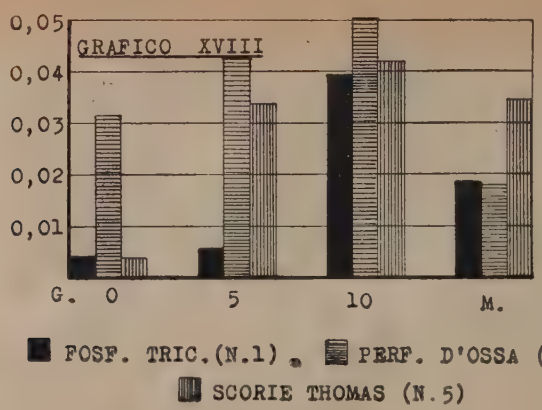


TABELLA XVIII.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta nel					
		Fosfato tricalcico		Perfosfato d'ossa		Scorie Thomas	
		Assol. gr.	Media %	Assol. gr.	Media %	Assol. gr.	Media %
230–232	Iniziale	0.0040	8.4	0.0304	62.4	0.0035	7 –
233–235	»	0.0044		0.0320		0.0035	
236–238	5 –	0.0048	10.8	0.0500	95.1	0.0322	67.8
239–241	5 –	0.0060		0.0451		0.0356	
242–244	10 –	0.0422	79.2	**0.0508**	101.2	0.0400	84.2
245–247	10 –	0.0370		0.0504		0.0442	
Solubilizzazione media		0.0183	36.6	0.0179	35.8	**0.0345**	69 –
PH Iniziale		5.1		3.1		6.8	
PH Finale		3.4		3.1		4.5	

Esperienza XIX. — Non ci fermammo di più nello studio dei fosfati semisolubili; ci si propose invece di compiere alcune prove su diversi campioni di fosforiti, di diversa provenienza e di diverso titolo in P_2O_5, incominciando dall'esperienza che veniamo ad esporre.

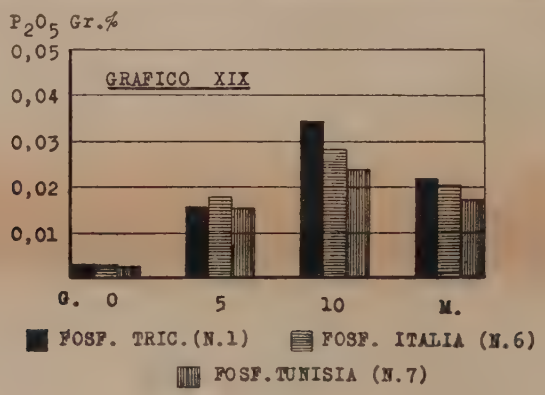
Le fosforiti esaminate nel corso di questa esperienza furono: fosforite « Italia » delle miniere di Kosseir (Egitto) e fosforite di Tunisia.

I risultati (tabella XIX e grafico XIX) dimostrarono quasi la stessa assimilabilità per il fosfato tricalcico e la fosforite « Italia » e leggermente inferiore per la fosforite di Tunisia.

In particolare la fosforite di Kosseir dimostrò di essere attaccata più prontamente e con la stessa intensità, nel tempo, del fosfato tricalcico, sebbene con una solubilizzazione massima minore; la fosforite di Tunisia invece fu attaccata con la stessa prontezza del fosfato tricalcico, ma con minore intensità e minore solubilizzazione massima.

TABELLA XIX.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta nel					
		Fosfato tricalcico		Fosforite «Italia»		Fosforite di Tunisia	
		Assol. gr:	Media %	Assol. gr.	Media %	Assol. gr.	Media %
248–250	Iniziale	0.0031	5.8	0.0024	5.6	0.0025	5.2
251–253	»	0.0027		0.0032		0.0027	
254–256	5	0.0137	31.6	0.0178	36.2	0.0145	31.2
257–259	5	0.0180		0.0185		0.0167	
260–262	10	**0.0356**	68.4	0.0316	56.6	0.0258	48 –
263–265	10	0.0329		0.0250		0.0222	
Solubilizzazione media		**0.0221**	44.2	0.0204	40.8	0.0172	34.4



Esperienza XX. — Le fosforiti di cui fu determinata l'assimilabilità furono: fosforite del Marocco (n. 8), Marchallinschen (n. 9), Gran Concordia (n. 10), Tennessee (n. 11), Curaçao (n. 12), sempre in rapporto al fosfato tricalcico (n. 1).

I risultati son riportati nella tabella XX e nel grafico XX. La solubilità iniziale risultò pressochè identica in tutti i campioni in esame.

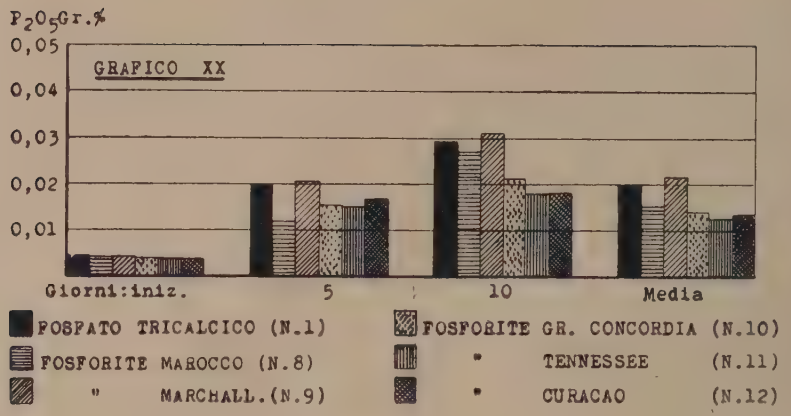
La facilità d'attacco (solubilizzazione al 5° giorno) risultò nell'ordine: 9–1–12–10–11–8, quindi generalmente minore nelle fosforiti che nel controllo, tranne nella fosforite Marchallinschen.

La solubilizzazione massima (10 giorno) risultò nell'ordine 9–1–8–10–12–11 con prevalenza sul fosfato della sola fosforite Marchallinschen.

La solubilizzazione media risultò nello stesso ordine della massima.

TABELLA XX.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta nel											
		Fosfato tricalcico		Fosforite N. 8		Fosforite N. 9		Fosforite N. 10		Fosforite N. 11		Fosforite N. 12	
		Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%
266 271	0	0.0044	8.8	0.0043	8.6	0.0041	8.2	0.0040	8 –	0.0039	8 –	0.0039	7.8
272-277	5	0.0198	23.4	0.0206	41.2	0.0154	30.8	0.0149	29.8	0.0167	29.8	0.0167	33.4
278-283	10	0.0293	53.8	**0.0310**	62 –	0.0211	42.2	0.0179	35.8	0.0181	35.8	0.0181	36.2
Soluz. media . . .		0.0201	40.2	0.0153	30.6	**0.0215**	43 –	0.0141	30.2	0.0124	24.8	0.0135	27 –



Esperienza XXI. — Ebbe per scopo la determinazione dell'assimilabilità delle fosforiti:

Haiger Nassau (n. 13), Limburg (n. 14), Amberg (n. 15), Gapsa (n. 16), Land Pebble (n. 17).

La solubilizzazione media fu anche questa volta poco differente dall'una all'altra fosforite.

Le altre solubilizzazioni dettero i seguenti risultati (tabella XXI, grafico XXI) nell'ordine in cui appresso:

solubilizzazione al 5° giorno: 16–1–15–17–14–13
» al 10° » 14–17–15–1–16–13
» media 1–16–14–15–17–13

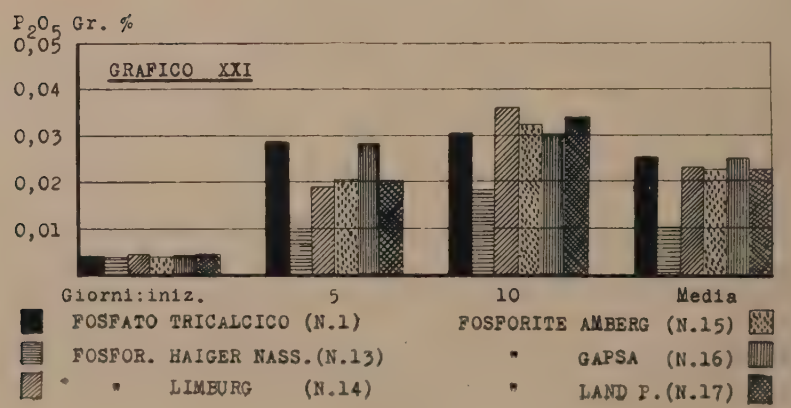


TABELLA XXI.

Ricerca N.	Dopo giorni	P_2O_5 disciolta nel											
		Fosfato tricalcico		Fosforite N. 13		Fosforite N. 14		Fosforite N. 15		Fosforite N. 16		Fosforite N. 17	
		Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%	Assol. gr.	%
284-289	0	0.0041	8.2	0.0038	7.6	0.0043	8.6	0.0040	8 –	0.0042	8.4	0.0043	8.6
290 295	5	0.0284	56.8	0.0096	19.2	0.0191	38.2	0.0204	40.8	0.0285	57 –	0.0200	40 –
296 301	10	0.0307	61.4	0.0184	36.8	**0.0363**	72.6	0.0332	66.4	0.0303	60.6	0.0342	68.4
Soluz. media . . .		**0.0254**	50.8	0.0102	20.4	0.0234	46.8	0.0228	45.6	0.0252	50.4	0.0228	45.6

9. – *Altre applicazioni del metodo proposto.*

Oltre che per lo studio dell'assimilabilità dei fosfati insolubili in rapporto al contenuto microbiologico del terreno, il metodo può benissimo servire alla determinazione dell'assimilabilità del fosforo contenuto in terreni di qualsiasi natura.

Unica modificazione da apportarvi è quella di sostituire il fosfato con quantità appropriate del terreno in esame, in cui si sia previamente determinato il fosforo totale solubile in acidi forti e, possibilmente, anche quello solubile in acidi deboli.

Naturalmente per la determinazione del fosforo solubilizzato si applicherà lo stesso metodo, prelevando una certa quantità di liquido dai substrati e filtrando; però oltre la filtrazione sarà bene eseguire un lavaggio accurato della parte di terreno rimasta sul filtro.

Il metodo batteriochimico che si propone per la valutazione dell'anidride fosforica non è detto non possa servire, opportunamente modificato nelle sue modalità, anche per quella di altri biogeni, sempre traendo profitto dall'attività dissolutiva delle colture: così ad esempio volendo servirsene per la valutazione di un concime azotato non si dovrebbe far altro che sostituirlo al solfato ammonico della soluzione nutritiva e studiarne l'effetto sulla solubilizzazione del fosfato tricalcico in rapporto ad una sorgente azotata testimone.

Ciò sarebbe particolarmente utile per lo studio delle azioni dei materiali concimanti insolubili o di quelli che Perotti chiama « concimi indiretti » o « concimazioni dei batteri ».

Parte II. — Esperimenti su coltivazioni - Metodo diretto.

Parallelamente alle esperienze di cui si è riferito precedentemente si fecero anche prove di coltivazione di frumento concimato con i fosfati di cui sopra.

Furono allestite tre serie di vasi, in terra cotta (normali vasi da giardinieri), comprendenti 18 vasi ciascuna; nella prima serie si posero per ciascun vaso kg. 12 circa di terra di giardino della seguente composizione:

Acqua igroscopica	3,87 %	Azoto totale	0,16 %
Sostanza organica	5,71 »	Anidride fosforica totale	0,20 »
			pH 7,2
Argilla	26,86 »	Ossido di potassio totale	0,18 »
Calcare	12,40 »	Sabbia	51,16 »

prelevata dall'orto del laboratorio ed asciugata al sole; nella seconda serie metà della terra fu sostituita con egual peso di sabbia d'Arno lavata e vagliata, sabbia siliceo-calcarea contenente circa il 15,9 % di calcare e tracce di anidride fosforica; i vasi della terza serie si riempirono invece con sabbia, senza tracce di terra.

I vasi delle singole serie furono poi suddivisi in 9 coppie a ciascuna delle quali si somministrò un concime fosfatico diverso e precisamente:

Coppia n. 1 = fosfato monopotassico
» n. 2 = » bipotassico
» n. 3 = perfosfato d'ossa
» n. 4 = » minerale
» n. 5 = scorie Thomas
» n. 6 = fosforite « Italia »
» n. 7 = » di Tunisia
» n. 8 = fosfato tricalcico.

Ai due vasi delle coppie n. 9 non fu invece aggiunto materiale fosfatico dovendo servire da coppia di controllo.

La quantità di fosfati aggiunti ai singoli vasi fu tale da equivalere ad una concimazione con 10 quintali ad ettaro di perfosfato minerale al 15 % di P_2O_5. I fosfati insolubili e semisolubili furono passati prima al vaglio in modo da presentare granuli non maggiori del diametro di mm. 0,1. I concimi furono sparsi in superficie e mescolati allo strato di terra più superficiale per circa 2–3 centimetri.

Nell'ultima decade di novembre fu eseguita la semina con 25–30 semi di frumento «Mentana» per ciascun vaso e quando tutti i semi furono germogliati si fece un diradamento lasciando cinque piantine per ciascun vaso.

I vasi furono lasciati all'aria aperta in luogo soleggiato e durante tutto il periodo vegetativo delle piante si fecero scerbature e zappettature superficiali onde evitare lo sviluppo di piante infestanti. Inoltre si innaffiarono i vasi quando le condizioni di umidità della terra lo richiedevano; nell'innaffiamento però si ebbe cura di somministrare poca acqua e spesso in modo da evitare il dilavamento della parte solubile dei concimi.

Alla fine di giugno il frumento giunse a maturazione e se ne operò il taglio avendo cura di eliminare tutte e solo le radici. Tutta la parte aerea delle piante fu essiccata al sole e pesata vaso per vaso. I risultati ottenuti dai singoli vasi delle varie coppie furono molto netti e concordi, avendosi scarti insignificanti da vaso a vaso. Ciò nonostante abbiamo creduto opportuno di riportare un solo valore dato della somma dei due vasi delle singole coppie.

Dalle spighe furono estratti i semi e pesati; il loro peso detratto da quello delle piante dette il peso della paglia.

Nelle tabelle XXII–XXV sono esposti i risultati delle pesate.

Le piante furono inoltre seccate a 100° C. fino a constanza di peso ed analizzate chimicamente per trovare la quantità di ceneri e quella di anidride fosforica in esse contenute. I risultati analitici son riportati nelle tabelle XXVI–XXIX.

Nella tabella XXX son riportati i risultati ottenuti dalle diverse categorie di materiali fosfatici di cui si fece uso e cioè:

1° materiali fosfatici completamente solubili in acqua (fosfati mono e bipotassico);

2° materiali fosfatici parzialmente solubili in acqua (perfosfati minerale e di ossa);

3° materiali fosfatici praticamente insolubili in acqua (fosforiti scorie, fosfato tricalcico);

4° controllo (nessuna sorgente di $P_2 O_5$ estranea al mezzo di coltura).

Da questa tabella è facile rilevare come i fosfati della categoria III abbiano dato, sotto ogni rapporto, i migliori risultati; a questi seguono quelli della categoria II, indi quelli della I e da ultimo, naturalmente ad una certa distanza, il controllo. Per quel che riguarda l'assimilabilità dei fosfati va notato però che i fosfati solubili hanno avuto una utilizzazione minima, tanto da restare, sia come quantità assoluta che come % della sostanza secca, molto al di sotto del controllo.

Tra i fosfati della III categoria (insolubili) vi sono divergenze piuttosto notevoli in quanto come quantità assoluta di prodotto il primato spetta alla fosforite « Italia » seguìta dagli altri tre che si equivalgono tra loro, mentre come quantità di fosforo assimilato in relazione alla sostanza organica prodotta migliori di tutti risultano le scorie Thomas a forte distanza dagli altri tre fosfati che quasi si equivalgono.

TABELLA XXII. — *Prodotto ottenuto dai vasi contenenti terra.*

Materiale fosfatico	Piante N.	Culmi N.	Peso delle piante Grammi	Peso della paglia Grammi	Semi		
					N.	Peso grammi	100 semi Grammi
Fosfato monopotassico	10	10	27.6048	13.9421	261	13.6627	5.24
Fosfato bipotassico	10	10	26.3917	14.6972	263	11.6945	4.45
Perfosfato d'ossa	10	10	22.8617	11.7997	262	11.0620	4.23
Perfosfato minerale	10	10	25.4934	12.7248	250	12.7686	5.11
Scorie Thomas	10	10	27.4158	14.3518	254	13.0640	5.14
Fosforite « Italia »	10	10	21.4433	11.9933	241	9.4500	3.92
Fosforite di Tunisia	10	10	25.5713	13.9287	242	11.6426	4.81
Fosfato tricalcico	10	10	20.6416	10.6941	235	9.9475	4.23
Controllo (nulla)	10	10	26.2917	12.7377	244	13.5540	5.55
Totale . . .	90	90	223.7153	116.8694	2252	106.8459	4.74

TABELLA XXIII. — *Prodotto ottenuto dai vasi contenenti miscuglio di terra e sabbia.*

Materiale fosfatico	Piante N.	Culmi N.	Peso delle piante Grammi	Peso della paglia Grammi	Semi		
					N.	Peso grammi	100 semi Grammi
Fosfato monopotassico.	10	10	13.8859	6.4995	154	7.3864	4.79
Fosfato bipotassico	10	11	12.5830	7.6582	148	4.9248	3.33
Perfosfato d'ossa	10	10	12.2102	6.9574	143	5.2528	3.67
Perfosfato minerale	10	10	17.6685	9.1445	189	8.5240	4.51
Scorie Thomas	10	10	11.8328	6.3160	135	5.5168	4.09
Fosforite « Italia »	10	11	18.0556	9.2748	220	8.7808	4 —
Fosforite di Tunisia	10	11	17.3583	9.4029	180	7.9554	4.42
Fosfato tricalcico	10	10	15.8184	8.6950	168	7.1234	4.24
Controllo (nulla)	10	10	13.1891	7.4057	147	5.7840	3.93
Totale . . .	90	93	132.6018	71.3534	1484	61.2484	4.13

TABELLA XXIV. — *Prodotto ottenuto con vasi contenenti sabbia.*

Materiale fosfatico	Piante N.	Culmi N.	Peso delle piante Grammi	Peso della paglia Grammi	Semi		
					N.	Peso grammi	100 semi Grammi
Fosfato monopotassico	10	10	20.4158	11.8622	184	8.5536	4.65
Fosfato bipotassico	10	10	21.6449	12.4603	208	9.1846	4.42
Perfosfato d'ossa	10	10	17.6504	9.3751	194	8.2753	4.26
Perfosfato minerale	10	12	22.0022	11.8738	227	10.1284	4.46
Scorie Thomas	10	11	22.6229	13.0691	242	9.5538	3.95
Fosforite « Italia »	10	18	53.8123	34.7593	411	19.0530	4.64
Fosforite di Tunisia	10	10	18.1153	9.1775	183	8.9378	4.88
Fosfato tricalcico	10	10	24.3266	13.1116	237	11.2150	4.72
Controllo (nulla)	10	10	11.0421	7.3291	105	3.7130	3.54
Totale . . .	90	101	211.6325	123.0180	1991	88.6145	4.45

TABELLA XXV. — *Prodotto complessivo ottenuto con i diversi materiali fosfatici.*

Materiale fosfatico	Piante N.	Culmi N.	Peso delle piante Grammi	Peso della paglia Grammi	Semi		
					N.	Peso grammi	100 semi Grammi
Fosfato monopotassico	30	30	61.9065	32.3032	599	29.6027	4.94
Fosfato bipotassico	30	31	60.6196	34.8157	619	25.8039	4.17
Perfosfato d'ossa	30	30	52.7223	28.1322	599	24.5901	4.10
Perfosfato minerale	30	32	65.1641	33.7431	666	31.4210	4.72
Scorie Thomas	30	31	61.8715	33.7369	631	28.1346	4.46
Fosforite « Italia »	30	39	93.3112	56.0274	872	37.2838	4.27
Fosforite di Tunisia	30	31	61.0449	32.5091	605	28.5358	4.72
Fosfato tricalcico	30	30	60.7866	32.5007	640	28.2859	4.42
Controllo (nulla)	30	30	50.5229	27.4725	496	23.0510	4.05
Totale	270	284	567.9496	311.2408	5727	256.7088	4.48

TABELLA XXVI. — *Analisi delle piante coltivate in vasi contenenti terra.*

Materiale fosfatico	Sostanza prod. seccata a 100 C. Gr.	Umidità		Ceneri		P_2O_5	
		Assoluta Gr.	% sost. secca	Assoluta Gr.	% sost. secca	Assoluta Gr.	% sost. secca
Fosfato monopotassico.	25.8000	1.8048	7 —	1.0260	3.98	0.0775	0.309
Fosfato bipotassico	24.4982	1.8935	7.73	1.0943	4.47	0.0362	0.148
Perfosfato d'ossa	21.3347	1.5270	7.16	1.2554	5.88	0.0833	0.396
Perfosfato minerale	23.7592	1.7342	7.30	1.2582	5.29	0.1393	0.586
Scorie Thomas	25.4850	1.9308	7.57	1.4948	5.87	0.1510	0.592
Fosforite « Italia »	19.9420	1.5013	7.53	1.0018	5.02	0.0816	0.409
Fosforite di Tunisia	24.1348	1.4365	6 —	1.3275	5.50	0.0797	0.330
Fosfato tricalcico	19.2156	1.4260	7.42	0.8550	4.23	0.0804	0.398
Controllo (nulla)	24.4177	1.8740	7.67	1.0556	4.32	0.1009	0.413
Totale . . .	208.5872	15.1281	7.25	10.3686	4.95	0.8299	0.398

TABELLA XXVII. — *Analisi delle piante coltivate in vasi contenenti miscuglio di terra e sabbia.*

Materiale fosfatico	Sostanza prod. seccata a 100 C. Gr.	Umidità		Ceneri		P_2O_5	
		Assoluta Gr.	°/o sost. secca	Assoluta Gr.	°/o sost. secca	Assoluta Gr.	°/o sost. secca
Fosfato monopotassico	13.1019	0.7840	5.98	0.7285	5.56	0.0396	0.302
Fosfato bipotassico	11.8244	0.7586	6.42	0.6470	5.47	0.0425	0.359
Perfosfato d'ossa	11.4150	0.7952	7.00	0.7244	6.42	0.0398	0.348
Perfosfato minerale	16.5342	1.1343	6.86	0.9722	5.88	0.0494	0.300
Scorie Thomas	11.0820	0.7508	6.77	0.6850	6,18	0.0766	0.691
Fosforite « Italia »	16.8540	1.2015	7.13	0.7550	4.48	0.447	0.264
Fosforite di Tunisia	16.2257	1.1326	6.98	0.6907	4.26	0.0705	0.435
Fosfato tricalcico	14.8136	1.0048	6.78	0.6815	4.60	0.0459	0.309
Controllo (nulla)	12.4059	0.7832	6.31	0.6325	5.99	0.0352	0.284
Totale . . .	124.2567	8.3450	8.80	6.5268	5.25	0.4442	0.358

TABELLA XXVIII. — *Analisi delle piante coltivate in vasi contenenti sabbia.*

Materiale fosfatico	Sostanza prod. seccata a 100 C. Gr.	Umidità		Ceneri		P_2O_5	
		Assoluta Gr.	°/o sost. secca	Assoluta Gr.	°/o sost. secca	Assoluta Gr.	°/o sost. secca
Fosfato monopotassico	18.9544	1.4514	7.71	1.0920	5.76	0.0611	0.322
Fosfato bipotassico	20.1389	1.5060	7.48	0.9826	4.86	0.0407	0.202
Perfosfato d'ossa	16.5231	1.1273	6.81	0.8124	4.91	0.0578	0.350
Perfosfato minerale	20.4512	1.5510	7.59	1.0058	4.92	0.0471	0.230
Scorie Thomas	21.0582	1.5647	7.43	1.2405	5.89	0.0536	0.254
Fosforite « Italia »	49.8528	3.9595	7.94	1.7115	3.43	0.1742	0.350
Fosforite di Tunisia	16.7953	1.3200	7.32	0.8704	5.24	0.0402	0.239
Fosfato tricalcico	22.7140	1.6126	7.05	1.0270	4.52	0.0668	0.294
Controllo	10.3043	0.7378	7.16	0.5250	5.15	0.0298	0.289
Totale	196.7922	14.8403	7.52	9.2672	4.71	0.5713	0.290

TABELLA XXIX. — *Analisi delle piante (somma delle tre tabelle precedenti).*

Materiale fosfatico	Sostanza prod. seccata a 100 C. Gr.	Umidità		Ceneri		P_2O_5	
		Assoluta Gr.	% sost. secca	Assoluta Gr.	% sost. secca	Assoluta Gr.	% sost. secca
Fosfato monopotassico	57.8563	4.0502	7 —	2.8465	4.92	0.1782	0.308
Fosfato bipotassico	56.4615	4.1581	7.36	2.7239	4.82	0.1194	0.211
Perfosfato d'ossa	49.2728	3.4495	7 —	2.8122	5.69	0.1809	0.367
Perfosfato minerale	60.7446	4.4195	7.27	3.2362	5.33	0.2358	0.388
Scorie Thomas	57.6252	4.2463	7.37	3.4203	5.94	0.2812	0.486
Fosforite « Italia »	86.6488	6.6623	7.69	3.4683	4 —	0.3005	0.348
Fosforite di Tunisia	57.1558	3.8891	6.80	2.8886	5.05	0.1904	0.333
Fosfato tricalcico	56.7432	4.0434	7.13	2.5635	4.52	0.1931	0.340
Controllo	47.1279	3.3950	7.20	2.2031	4.68	0.1659	0.352
Totale	529.6361	38.3134	7.23	26.1626	4.94	1.8454	0.348

TABELLA XXX.

Prodotto medio complessivo ottenuto dalle diverse categorie di materiali fosfatici.

Materiale fosfatico	Culmi N.	Peso piante grammi	Peso paglia grammi	Semi			P_2O_5	
				N.	grammi	100 semi grammi	grammi	% sostanza secca
Solubile	30.50	61.26	33.56	609	27.70	4.55	0.1488	0.260
Semisolubile	31 —	58.94	30.93	632	28.01	4.60	0.2083	0.379
Insolubile	32.75	69.26	38.70	687	30.56	4.45	0.2413	0.375
Controllo (nulla) . .	30 —	50.52	27.47	496	23.05	4.65	0.1659	0.352

Riassumendo si può concludere che:

1° Tutti i fosfati sperimentati hanno azione favorevole sulla quantità di prodotto;

2° Tale qualità è posseduta al massimo grado (nelle condizioni sperimentate) dalla fosforite « Italia » di Kosseir cui seguono gli altri fosfati nell'ordine: perfosfato minerale, fosfato monopotassico, scorie Thomas, fosforite di Tunisia, fosfato tricalcico, fosfato bipotassico, perfosfato d'ossa.

3° Non tutti i fosfati sperimentati sono ugualmente assimilabili dal frumento; anzi, alcuni diminuiscono anche l'assimilabilità dei fosfati contenuti nel terreno (controllo). Sotto questo punto di vista quindi i fosfati in esame si dividono in due gruppi uno dei quali ha azione che può dirsi positiva, l'altro negativa; fra i primi sono da elencarsi in ordine decrescente i seguenti: scorie Thomas, perfosfato minerale e perfosfato d'ossa; nel secondo gruppo: fosforite « Italia », fosfato tricalcico, fosforite di Tunisia, fosfato monopotassico, fosfato bipotassico.

A questo punto cade acconcio il ricordare lo scopo per il quale furono eseguite queste esperienze e cioè di ricercare quali rapporti esistano tra il primo gruppo di esperienze o esperienze di laboratorio ed il secondo gruppo o esperienze di coltivazione. Ci si era proposti cioè di osservare se il metodo « indiretto » di valutazione dell'assimilabilità dei fosfati da noi proposto trovi conferma nel metodo di valutazione « diretto ».

Perciò bisogna riportarsi a quanto più volte si è ripetuto nella prima parte del lavoro e che cioè il metodo vale quasi esclusivamente per i fosfati insolubili. Bisogna cioè trascurare i fosfati solubili e semisolubili introdotti nella sperimentazione a puro titolo di curiosità sperimentale ed a completamento del quadro e fare un parallelo tra i risultati ottenuti col metodo diretto e con quello indiretto dall'esame dei fosfati insolubili.

Si elencano perciò qui sotto in ordine decrescente di assimilabilità i fosfati sperimentati con i due metodi:

A) *Metodo indiretto* (solubilizzazione media)	B) *Metodo diretto*
Scorie Thomas	Scorie Thomas
Fosfato tricalcico	Fosforite « Italia »
Fosforite « Italia »	Fosfato tricalcico
Fosforite di Tunisia	Fosforite di Tunisia

Unica differenza adunque è l'inversione dei risultati forniti da fosfato tricalcico con quelli della fosforite « Italia ». Da notare però che mentre col primo metodo la superiorità del fosfato tricalcico era minima, quasi insignificante, col secondo metodo è trascurabile la superiorità della fosforite, ciò che equivale a dire che i due materiali fosfatici si equivalgono come valore di assimilabilità, il che si deduceva anche dal metodo indiretto interpretandone i risultati non *ad litteram* e cioè al milligrammo, ma con una certa larghezza di vedute. Del resto anche con il primo metodo si era avvertito che la solubilizzazione massima della fosforite era minore di quella del fosfato tricalcico, ma questo era meno prontamente attaccabile che non quella.

Si conclude adunque che il metodo batteriochimico di valutazione indiretto, riceve da quello diretto una brillante conferma, quale era da attendersi dalle basi teoriche preposte al presente studio, desunte appunto da quello che è il meccanismo da cui i fosfati stessi traggono essenzialmente la loro assimilabilità: la vita microrganica che ferve nel terreno agrario.